

**Zum Vorkommen von Nitrosaminen in Silage sowie Panseninhalt
und Milch von Rindern**

Christel Heerdegen

1979

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan)
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Zum Vorkommen von Nitrosaminen in Silage sowie Panseninhalt
und Milch von Rindern

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Christel Heerdegen
aus
München

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan:	Professor Dr. H. Kräußlich
Referent:	Professor Dr. G. Terplan
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 23. Februar 1979



Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	Chemie der Nitrosamine (NA)	2
2.2	Die NA-Synthese beeinflussende Faktoren	4
2.2.1	Präkursoren	4
2.2.2	Wasserstoffionenkonzentration	5
2.2.3	Temperatur	6
2.2.4	Mikroorganismen	6
2.2.5	Katalysatoren	8
2.2.6	Inhibitoren	8
2.3	Vorkommen von Präkursoren	9
2.3.1	Boden	10
2.3.1.1	Nitrosierende Ausgangsstoffe	10
2.3.1.2	Nitrosierbare Ausgangsstoffe	10
2.3.2	Pflanzen	11
2.3.2.1	Nitrosierende Ausgangsstoffe	11
2.3.2.2	Nitrosierbare Ausgangsstoffe	12
2.3.3	Zubereitetes Futter aus pflanzlichem und tierischem Material	13
2.3.3.1	Nitrosierende Ausgangsstoffe	13
2.3.3.2	Nitrosierbare Ausgangsstoffe	13
2.3.4	Pansen	14
2.3.5	Milch	14
2.3.5.1	Nitrosierende Ausgangsstoffe	14
2.3.5.2	Nitrosierbare Ausgangsstoffe	17
2.4	Voraussetzungen für das Vorkommen bzw. die Entstehung von NA	17
2.4.1	Boden	17
2.4.2	Pflanzen	18
2.4.3	Zubereitetes Futter	19
2.4.3.1	Silage	19
2.4.3.2	Futtermittel tierischer Herkunft	22
2.4.4	Pansen	22
2.4.5	Milch	25

3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	27
3.1	Material	27
3.1.1	Untersuchung von Futter, Panseninhalt und Milch	27
3.1.1.1	Futtermittel	27
3.1.1.2	Panseninhalt	28
3.1.1.3	Milch	28
3.1.2	Untersuchungen zum Verbleib von NA im Panseninhalt	29
3.1.2.1	Verabreichung von NA an laktierende Rinder	29
3.1.2.2	In vitro-Versuch mit Pansensaft vom Schaf	30
3.1.3	Modellversuche zur Bildung von NA in Milch	31
3.2	Methodik	32
3.2.1	Nitrit-Nitratbestimmung	33
3.2.2	NA-Analytik	33
3.3	Ergebnisse und deren Besprechung	34
3.3.1	Nitrit-, Nitrat- und NA-Gehalte von pflanzlichen Futtermitteln und Panseninhalt geschlachteter und lebender Tiere sowie in roher und erhitzter Milch	34
3.3.1.1	Pflanzliche Futtermittel	34
3.3.1.2	Panseninhalt geschlachter und lebender Tiere	36
3.3.1.3	Milch	37
3.3.2	Untersuchungen zum Verbleib von NA im Panseninhalt von lebenden Tieren und in vitro	40
3.3.2.1	Verabreichung von NA an Milchkühe	40
3.3.2.2	In vitro-Versuch zum mikrobiellen Abbau von NA im Pansensaft	41
3.3.3	Modellversuche zur Bildung von NA in Milch	42
3.3.3.1	Untersuchungen an roher und erhitzter Sammelmilch mit und ohne Nitratzusatz	42
3.3.3.2	Untersuchungen an frischer Milch aus Einzelmelken mit Nitritzusatz, gekocht und autoklaviert	44
4	DISKUSSION	45
5	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	51
6	LITERATURVERZEICHNIS	53

1 EINLEITUNG

Seit etwa 20 Jahren ist die toxische Wirkung der Nitrosamine (NA) bekannt. In geringen Mengen haben diese Verbindungen langfristig mutagene, teratogene und kanzerogene Wirkung. Seit der Erkennung, insbesondere der kanzerogenen Wirkung, wurden zunehmend Nahrungsmittel auf Gehalt an NA sowie Nitrat und Nitrit als Vorläufer dieser Verbindungen untersucht bzw. die Bedeutung dieser Stoffe eingehend diskutiert. So gibt es u.a. Berichte über den Nachweis von NA in Milchprodukten (ALLISTON et al., 1972; CERUTTI et al., 1975; CROSBY et al., 1972; EISENBRAND und MARQUARDT, 1969; FREIMUTH und GLÄSER, 1970). Dem Nitrat als Zusatz bei der Schnittkäseherstellung und dem Nitritgehalt anderer Lebensmittel, die mit Käse gemeinsam zubereitet werden, kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Unmittelbar in Milch waren NA bisher nur von HEDLER und MARQUARDT (1968) mit inzwischen überholten Nachweismethoden gefunden worden. Es liegen jedoch Berichte von Versuchen vor, in denen bei Verabreichung von extrem hohen NA-Dosen an Wiederkäuer der Übertritt von NA in die Milch nachgewiesen worden ist (JUSZKIEWICZ und KOWALSKI, 1973).

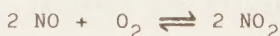
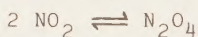
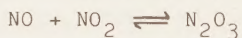
Da im Futter für Milchtiere sowohl Nitrate als auch Amine vorhanden sind, wurde die Möglichkeit erwogen, daß im Pansen nach Nitratreduktion auch NA entstehen oder diese Stoffe bei der Fermentation in Futtermitteln gebildet werden. Aufgabe dieser Arbeit war daher zu untersuchen, ob bei der in der Landwirtschaft üblichen Fütterung

1. in Futtermitteln NA entstehen können,
2. im Wiederkäuermagen die Synthese von NA erfolgt,
3. gegebenenfalls im Pansen vorhandene NA auch in die Milch übertreten können,
4. ob NA sich in der Milch selbst unter bestimmten Voraussetzungen bilden können.

2 LITERATUR

2.1 Chemie der Nitrosamine (NA)

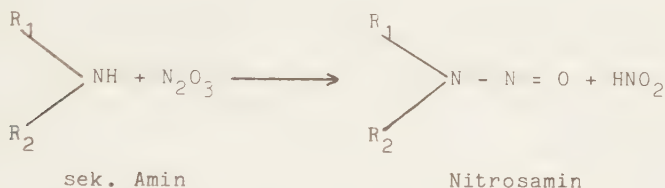
Die N-Nitrosoverbindungen, zu denen die NA gehören, bilden eine große Gruppe von Substanzen, deren gemeinsames Merkmal die N-Nitrosogruppierung ($=N-N=O$) ist (SIEBER und BLANC, 1978). Voraussetzung für die NA-Synthese ist die gleichzeitige Anwesenheit sowohl (mittelbar und unmittelbar) nitrosierender als auch nitrosierbarer Reaktionspartner. Als nitrosierende Vorläufer der NA sind Nitrat NO_3 , Nitrit NO_2 , salpetrige Säure HNO_2 sowie nitrose Gase zu betrachten. Letztere setzen sich aus einem Gemisch von Stickstoffmonoxid NO , Stickstoffdioxid NO_2 , Distickstofftetroxid N_2O_4 , und Distickstofftrioxid N_2O_3 zusammen und sind untereinander durch folgende Gleichgewichte verknüpft (SANDER und SCHWEINSBERG, 1972):



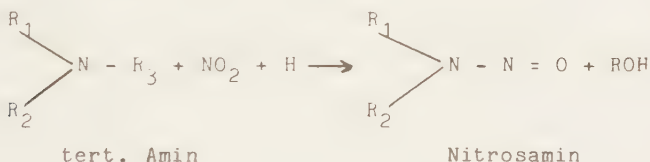
Als nitrosierbare Reaktionspartner sind sekundäre und tertiäre Amine, aber auch Alkylamide zu betrachten (PREUSSMANN, 1973; SANDER und SCHWEINSBERG, 1972; SIEBER und BLANC, 1978), ebenso sollen nach MARQUARDT (1971) auch Aminosäuren mit einer sekundären Aminogruppe nitrosierbar sein.

Amine sind organische Derivate des Ammoniaks NH_3 . Je nachdem, wieviele H-Ionen durch organische Reste ersetzt sind, werden die Amine als primär, sekundär und tertiär bezeichnet. In wäßriger Lösung reagieren Amine basisch. Der basische Charakter beruht auf einem freien Elektronenpaar am N-Atom. Je geringer die Basizität eines Amins ist, desto leichter wird es

bei saurem pH nitrosiert (DOBBERTIN, 1975). Nach MÖHLER et al. (1972), SANDER und SCHWEINSBERG (1972), SCANLAN (1975) und SEBRANEK und CASSENS (1973) stellt im für die NA-Synthese günstigsten pH-Bereich 1 - 4 das Anhydrid der salpetrigen Säure das reaktive Molekül dar.



Aus tertiären Aminen entstehen NA durch desalkylierende Nitrosierung (MARQUARDT, 1971):



Die Molekülreste R_1 und R_2 der NA können nach SANDER und SCHWEINSBERG (1972) sehr unterschiedlich gebaut sein. In den niedermolekularen, meist besonders stark kanzerogen wirkenden NA sind es einfache oder verzweigte Alkylreste, etwa Methyl- oder Äthylgruppen. Sie können aber auch aromatische Strukturen aufweisen. Die Seitenketten können miteinander verbunden sein, was zu zyklischen Verbindungen führt. Die karzinogene Wirkung nimmt mit steigender Länge der Alkylketten und mit fallender Basizität des dem NA zugrundeliegenden Amins ab.

2.2 Die NA-Synthese beeinflussende Faktoren

Die NA-Synthese wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. Als entscheidend für das Zustandekommen der Nitrosierungsreaktion gelten Azidität der Umgebung, relative, aber auch absolute Konzentration der Präkursoren und während der Reaktion herrschende Temperatur. Dazu kommen Einflüsse durch mikrobielle Tätigkeit, aber auch durch Verbindungen, die die Synthese blockieren oder katalysieren können. Im folgenden sollen diese Bedingungen einzeln betrachtet werden.

2.2.1 Präkursoren

Nach SANDER und SCHWEINSBERG (1972) bestehen folgende Relationen zwischen nitrosierenden und nitrosierbaren Agentien: Die Nitrosierungsreaktion ist von der Konzentration der Reaktionspartner abhängig. Dabei geht die Konzentration des Nitrits bei Alkylamiden linear, bei sekundären Aminen mit der zweiten Potenz und bei tertiären Aminen mit der dritten Potenz in die Reaktionsgleichung ein (Angaben für Reaktionen bei einer Temperatur von 100°C). Daraus läßt sich ableiten, daß die NA-Ausbeute von der zur Verfügung stehenden Nitritmenge abhängig ist. Dies geht auch aus Arbeiten von MÖHLER et al. (1972) und SCHWEINSBERG (1974) hervor. Danach spielt die Aminmenge in dem Bereich, wie er in Lebensmitteln zu erwarten ist, weder für die Geschwindigkeit der Nitrosierungsreaktion noch für die Menge der gebildeten NA eine Rolle.

MÖHLER et al. (1972) berichten von einem Modellversuch in Pufferlösung bei pH 6 und 37°C. Bei einem Verhältnis Nitrit: Amin = 10:1 ergab sich ein NA-Anstieg proportional zur Zeit über einige Tage, dann erfolgte eine Abnahme und schließlich die Beendigung der Reaktion. Bei Umkehrung des Verhältnisses der Reaktionspartner zueinander, nämlich Nitrit:Amin = 1:10 wurden nur für einige Stunden und in Spuren NA gebildet, dann kam die Reaktion zum Stillstand.

2.2.2 Wasserstoffionenkonzentration

Als optimal für die NA-Synthese werden Werte von pH 2 - pH 4 angegeben. Nach DOBBERTIN (1975) liegt das pH-Optimum für die NA-Synthese in wäßriger Lösung bei pH 3. Eine Erhöhung oder Erniedrigung des pH-Wertes führt zu einer Verlangsamung der Reaktion. Zwar erhöht eine Senkung des pH-Wertes die Konzentration des nitrosierenden Agens durch verstärkte Freisetzung salpetriger Säure aus Nitrit, führt bei zunehmender H-Ionenkonzentration aber auch zur Salzbildung bei den Aminen. Da nach MÖHLER et al. (1972) als Reaktionspartner für salpetrige Säure ausschließlich das freie Amin in Frage kommt, ergibt sich aus der unterschiedlichen Basizität der verschiedenen Amine für jedes Amin ein eigener, optimaler pH-Wert zur NA-Synthese. Wie MÖHLER et al. (1972) und SIEBER und BLANC (1978) berichten, liegen unprotonierte, schwach basische Amine auch bei höheren pH-Werten in Konzentrationen vor, die eine Nitrosierung ermöglichen, während in diesem pH-Bereich die stark basischen Amine nur zu einem geringen Teil in unprotonierten Zustand vorhanden sind. Je stärker basisch ein Amin reagiert, desto schwerer ist es also in das Nitrosoderivat zu überführen. Bei sekundären Aminen liegt nach SANDER und SCHWEINSBERG (1972) die Höchstaussbeute der Nitrosierungsreaktion nahe pH 3, wohingegen tertiäre Amine nur bei pH 3 - 6 und auch dann bloß bei höheren Temperaturen reagieren. Bei geringerer Konzentration der NA-Präkursoren kann durch eine Senkung des pH-Wertes die Synthese in Gang gebracht werden (SEBRANEK und CASSENS, 1973; SIEBER und BLANC, 1978), während bei hoher Konzentration derselben eine Synthese auch noch im schwach alkalischen Bereich stattfindet (pH 7,6). Bei gleichzeitiger mikrobieller Tätigkeit soll nach THACKER und BROOKS (1974) eine NA-Synthese noch bis pH 9 stattfinden.

2.2.3 Temperatur

Die Abhängigkeit der Nitrosierungsrate von der Temperatur wird zwar von diversen Autoren erwähnt (FAN und TANNENBAUM, 1973 a; HAVERY et al., 1976; MÖHLER et al., 1972; SANDER und SCHWEINSBERG, 1972; SIEBER und BLANC, 1978), doch gibt es wenig konkrete Angaben zu diesem Thema. Bei mikrobiell beeinflusster NA-Synthese ist natürlich eine Temperatur Voraussetzung, bei welcher die Bakterien aktiv sind, nämlich ca. 37°C. Doch auch die rein chemische Nitrosierung wird durch die Einwirkung von Wärme beschleunigt. Sie kann aber auch noch bei -18°C stattfinden. Ein in-vitro-Versuch von FAN und TANNENBAUM (1973 a) mit Pufferlösung und aufgelöster Trockenmilch ergab eine Verlangsamung der Nitrosierungsreaktion im 0°C-Bereich, während die Reaktion bei -18°C in gefrorenen Lösungen der bei 37°C entsprach, was damit erklärt wird, daß gewissermaßen ein Eisgitter ausfriert, in dessen flüssigen Zwischenräumen die Lösung relativ konzentrierter vorliegt.

2.2.4 Mikroorganismen

Nach SANDER und SCHWEINSBERG (1972) gelten für die Nitrosierung in Anwesenheit von Mikroorganismen die Voraussetzungen der rein chemischen NA-Synthese. Untersuchungen mit Bakterien in Pufferlösung ergaben, daß die Nitrosierungsreaktion auch in Bakterienkulturen im wesentlichen von chemischen, nicht aber von biologischen Mechanismen abhängt. Da jedoch der Stoffwechsel der meisten Bakterien bei einem pH-Wert von 4 zum Erliegen kommt, hören Bakterien bei stärker sauer reagierenden Lösungen auf, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, ohne daß ein für die chemische Nitrosierung optimaler pH-Wert erreicht werden kann. Der pH-Wert, bei welchem in Bakterienkulturen eine NA-Synthese mit maximaler Ausbeute

stattfindet, liegt deshalb höher als in Versuchen ohne Bakterien. Von FONG und CHANG (1973) wird nach Versuchen mit *Staphylococcus aureus* ebenfalls eine nicht enzymatische Förderung der NA-Synthese durch Reduktion von Nitrat zu Nitrit angegeben, während THACKER und BROOKS (1974) eine enzymatisch bedingte NA-Synthese durch *Proteus species* beschreiben. SANDER (1968) gibt nach Versuchen mit *E. coli*, *Proteus vulgaris* und *Serratia marcescens* an, daß "offenbar im Rahmen der bakteriellen Nitratreduktion ein Zwischenprodukt entsteht, das auch bei neutralem pH-Wert sekundäre Amine in wäßriger Lösung zu nitrosieren vermag". TATE und ALEXANDER (1976) beschreiben die Umwandlung von Trimethylamin zu Dimethylamin durch Mikrokokken und diskutieren die Möglichkeit einer bakteriell bedingten NA-Synthese durch die gleichen Mikrokokken. AYANABA und ALEXANDER (1973) geben denselben Vorgang (bakterielle Umwandlung von Trimethylamin zu Dimethylamin) für ein "unidentifiziertes Bakterium" an, das aber außerdem in Anwesenheit von Nitrit aus Dimethylamin das entsprechende NA zu bilden in der Lage ist. Weitere Versuche derselben Autoren mit *E. coli*, *Streptococcus epidermidis* sowie mit Aufschwemmungen verschiedener Mikroorganismen ließen den Rückschluß auf eine enzymatische NA-Synthese durch Bakterien zu. Rohenzymextrakte, aus Bakterien und Hefen gewonnen, hatten auf die NA-Synthese eine katalysierende Wirkung. Eine enzymatische, bakterielle Nitrosierung geben auch KUNISAKI et al. (1976) nach Versuchen mit *E. coli* an, und KLUBES et al. (1972) nach Versuchen mit Bakterien aus Ratteneingeweiden.

Daß Bakterien aber auch in der Lage sind, NA abzubauen, geht aus Versuchen von ROWLAND und GRASSO (1975) hervor. Der umfangreichste Abbau (innerhalb 20 Stunden) wurde durch *E. coli* und Laktobazillen erreicht, aber auch *Proteus species*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Streptococcus faecalis* konnten in gewissem Umfang NA abbauen.

2.2.5 Katalysatoren

Folgende Stoffe wurden von verschiedenen Autoren als katalytisch wirksam für die Nitrosierungsreaktion beschrieben: Halogenidionen wie Chlorid oder Bromid, besonders aber Jodid, dem die höchste Wirksamkeit zugesprochen wird. Katalysierend wirkt auch das Pseudohalogenid Rhodanid. Die aufgeführten Stoffe katalysieren die NA-Synthese wahrscheinlich unter Bildung von kovalenten Nitrosylverbindungen, welche effektivere nitrosierende Agentien sind als salpetrige Säure (DOBBERTIN, 1975; MÖHLER et al., 1972; SANDER, 1973; SANDER und SCHWEINSBERG, 1972; SIEBER und BLANC, 1978). SCHWEINSBERG (1974) gibt bei Anwesenheit katalytisch wirksamer Substanzen eine fast lineare Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes von der Nitritkonzentration an, d.h. für den Fall der Nitrosierung sekundärer Amine würden also Reaktionsgeschwindigkeit und NA-Ausbeute sich nur noch zum Teil mit dem Quadrat des vorhandenen Nitrits ändern, vielmehr aber zu gleichen Teilen von der Amin-, Nitrit- und Halogenidionen-Konzentration abhängig sein. Damit wäre die begrenzende Funktion der für die NA-Synthese zur Verfügung stehenden Nitritmenge aufgehoben. Allerdings kann der Nachweis der katalytischen Wirkung von Rhodanid- und Halogenidionen auf die NA-Synthese bisher nur für in vitro-Versuche als gesichert gelten, da im in vivo-Versuch zu viele Reaktionen nebeneinander ablaufen, um letztlich den sicheren Rückschluß auf eine katalysierte NA-Synthese zuzulassen.

2.2.6 Inhibitoren

Als blockierendes Agens in der NA-Synthese tritt Ascorbinsäure auf (DOBBERTIN, 1975; FAN und TANNENBAUM, 1973 b; MIRVISH, 1970; SANDER, 1973; SCHWEINSBERG, 1974; SEBRANEK und CASSENS, 1973; SIEBER und BLANC, 1978), auch Tannine und Huminsäuren sollen hemmende Eigenschaften besitzen (BOGOVSKI et al., 1972). Ascorbinsäure vermindert die NA-Synthese dadurch, daß sie so schnell mit Nitrit reagiert, daß sekundäre Amine nicht

mehr "zum Zug kommen". Diese Feststellung gilt sowohl für in vitro- als auch für in vivo-Versuche. Nach SANDER (1973) bindet ein Mol Ascorbinsäure zwei Mol Nitrit. Durch in vivo-Versuche wurde festgestellt, daß bei äquimolaren Konzentrationen von sekundären Aminen, Ascorbinsäure und Nitrit die Nitrosierungsreaktion fast vollständig abgeblockt wird.

2.3 Vorkommen von Präkursoren

Als nitrosierende Ausgangssubstanzen der NA-Synthese sind Nitrat, Nitrit bzw. salpetrige Säure und nitrose Gase zu bezeichnen. Nitrat ist regelmäßiger Bestandteil des Trinkwassers und besonders reichlich in pflanzlichen Produkten vertreten. Auch in Böden ist es stets vorhanden. Bei Einwirkung hoher Temperaturen und bei Reduktion durch Mikroorganismen entsteht aus Nitrat Nitrit. Dieses ist sehr reaktionsfreudig und überall dort anzutreffen, wo es kurz zuvor gebildet wurde, oftmals nur als Zwischenprodukt für weitere Reaktionen.

Außerdem werden Nitrat und Nitrit menschlicher und tierischer Nahrung zu Konservierungszwecken zugesetzt. Nitrose Gase kommen als Luftverunreinigung z.B. durch Industrie- und Fahrzeugabgase häufig vor, entstehen aber auch bei biologischer Oxidation, z.B. bei der Gärfutterherstellung (MARQUARDT, 1971; SANDER und SCHWEINSBERG, 1972).

Als nitrosierbare Reaktionspartner für die NA-Synthese sind in erster Linie sekundäre und tertiäre Amine, nach MARQUARDT (1971) aber auch Proteine, Aminosäuren und nach MÖHLER und HALLERMAYER (1973) auch Phospholipide zu nennen. Amine sind in organischem Material als Bestandteil von Enzymen und als Stoffwechselzwischenprodukte regelmäßig enthalten, sie entstehen nach KARLSON (1960) und SIEBER und BLANC (1978) durch Abbau stickstoffhaltiger Verbindungen und über die Decarboxylierung der entsprechenden Aminosäuren. Sowohl durch Erhitzen

als auch durch technologische Prozesse bei der Herstellung von Lebensmitteln (DOBBERTIN, 1975; MARQUARDT, 1971; MÖHLER et al., 1972) einerseits, durch mikrobielle Einwirkung andererseits, kann sich die Konzentration von Aminen erhöhen. Die Bildung von Aminen durch Mikroorganismen erfolgt nach MAYER (1976) am häufigsten über die Decarboxylierung von Aminosäuren.

2.3.1 Boden

2.3.1.1 Nitrosierende Ausgangsstoffe

Das Nitrat nimmt im Stickstoffkreislauf des Bodens eine primäre Stellung ein, denn im natürlichen Boden nimmt die Pflanze den Stickstoff in erster Linie in Nitratform auf. Alle organischen, stickstoffhaltigen Substanzen des Bodens treten in der Endphase der Mineralisation wieder als Nitrat in Erscheinung (BUCHNER et al., 1973). Besonders wichtige Reaktionen bei der Umsetzung von im Boden vorhandenen stickstoffhaltigen Verbindungen sind Nitrifikation und Denitrifikation. Nitrifikation und Denitrifikation hängen, da es sich um bakterielle Prozesse handelt, von Faktoren ab, die den Stoffwechsel der jeweils in Frage kommenden Bakterienart beeinflussen können.

Hier spielen die pH-Werte des Bodens, der Sauerstoffpartialdruck, die Gegenwart von Schwermetallionen oder bestimmten Giftstoffen sowie der Wassergehalt oder das Angebot kohlenstoffhaltiger Verbindungen eine entscheidende Rolle. In wasser-durchtränkten Böden können sich besonders bei starker Düngung oft beträchtliche Mengen an Nitrit anreichern (DOBBERTIN, 1975; SANDER und SCHWEINSBERG, 1972).

2.3.1.2 Nitrosierbare Ausgangsstoffe

Die Anwesenheit von Aminen im Boden wird in diversen Arbeiten vorausgesetzt BUCHNER et al., 1973; DRESSEL, 1973 und 1976;

SANDER und SCHWEINSBERG, 1972). TATE und ALEXANDER (1976) beschreiben als mikrobielles Abbauprodukt gewisser Pestizide im Boden Trimethylamin und Dimethylamin.

2.3.2 Pflanzen

2.3.2.1 Nitrosierende Ausgangsstoffe

Aus dem Boden aufgenommenes Nitrat dient den Pflanzen zum Aufbau von Aminosäuren und Proteinen. Die Konzentration dieses Salzes im Boden hat großen Einfluß auf die Stärke des Pflanzenwachstums, deshalb werden seit langem natürliche und neuerdings immer mehr künstliche stickstoffhaltige Düngemittel auf Feldern ausgebracht (SANDER und SCHWEINSBERG, 1972).

Nun gibt es Pflanzen, die besonders zur Speicherung von Nitrat neigen (SCHUPHAN, 1969; SIEBER und BLANC, 1978; WIESNER et al., 1970), andererseits wird die Speicherung von Nitrat auch durch die natürlichen ökologischen Bedingungen und die Kulturmaßnahmen des Menschen beeinflusst. Bei den Pflanzen, die als Viehfutter verwendet werden, tendieren folgende zur Akkumulation von Nitrat: Gerste, Roggen, Mais, grüner Klee, Zuckerrüben- und Futterrübenblatt, Futtersenf, Kartoffelkraut und Futtergräser. Als normal gelten Nitratgehalte von 20 - 300 mg/kg in Futterpflanzen. Bei entsprechender Düngung wurden aber Höchstwerte bei 900 mg/kg festgestellt. Bemerkenswert ist, daß verschiedene Unkräuter z.T. erhebliche Mengen an Nitrat speichern. So wurden in schwarzem Nachtschatten bis zu 10% Nitrat in der Trockensubstanz festgestellt (WIESNER et al., 1970). Das von der Pflanze aufgenommene Nitration wird u.a. über die Reduktion zu Nitrit zum Aufbau von Aminosäuren und Proteinen benötigt. Diese Synthese kann nur dann ohne nennenswerte Restmengen von Nitrat geschehen, wenn optimale Wachstumsfaktoren - wie Wasserversorgung, Lichtintensität und Temperaturen - gegeben sind. Dürreperioden, aber auch tiefe Temperaturen sowie

wenig Sonne haben Einfluß auf den Pflanzenstoffwechsel und damit auf die Nitratspeicherung. Mangel an Molybdän bzw. ein relativer Mangel an Molybdän in Relation zum Kupfergehalt des Bodens wirken sich ähnlich aus; die Folge ist ebenfalls Akkumulation von Nitrat.

Aber auch unter optimalen ökologischen Voraussetzungen kann es zur Nitratspeicherung kommen, wenn das Stickstoffangebot die Möglichkeiten des biochemischen Umsatzes übersteigt. Überreiche Stickstoffdüngung ist deshalb ebenfalls eine Ursache der Nitratspeicherung, wie auch gewisse Herbizide den Nitratgehalt von Pflanzen erhöhen (WIESNER et al., 1970). Während in lebenden, intakten Pflanzen Nitrit als Stoffwechselzwischenprodukt nur in Spuren vorkommt (DRESSEL, 1976), entsteht es nach dem Schnitt durch mikrobielle, enzymatische Umsetzung aus dem Nitrat.

2.3.2.2 Nitrosierbare Ausgangsstoffe

Amine als Bestandteile von Pflanzen werden in der Literatur mehrfach, meist ohne nähere Angaben, erwähnt (DRESSEL, 1976; SANDER und SCHWEINSBERG, 1972; SEBRANEK und CASSENS, 1973; SIEBER und BLANC, 1978). Die Konzentration wird mit 1 - 5 ppm angegeben. Alle Angaben beziehen sich auf Pflanzen, welche der menschlichen Ernährung dienen. Genannt werden an nitrosierbaren Agentien in Pflanzen: von MARQUARDT (1971) Arginin als Hauptbestandteil der Nichteiweißfraktion zahlreicher Kohlarten, Prolin, wesentlicher Bestandteil in Getreideprolamin, Dimethylamin und Diäthylamin in Getreide und Tee.

2.3.3 Zubereitetes Futter aus pflanzlichem und tierischem Material

2.3.3.1 Nitrosierende Ausgangsstoffe

Während der Silierung von Pflanzen und während der Lagerung von Silage kommt es zu einem mikrobiell bedingten Abbau des in den Pflanzen enthaltenen Nitrats zu Nitrit (WIESNER et al., 1970). Bei normalem Gärvorgang ist nach GROSS und RIEBE (1974) der Nitratabbau nur gering (30%). Über das gebildete Nitrit entstehen auch nitrose Gase. Bei Auftreten von Fehlgärungen ist mit verstärktem und langfristigem Abbau von Nitrat über die bekannten Zwischenprodukte zu rechnen. Besondere Verhältnisse liegen vor, wenn Nitrat oder Nitrit als Silierzusatz verwendet werden und so neben dem konservierenden Effekt eine höhere Konzentration der nitrosierenden Agentien erreicht wird.

Ebenfalls zur Konservierung wird Nitrat oder Nitrit auch anderen Futtermitteln tierischer Herkunft zugesetzt, z.B. Fischmehl (EISENBRAND und MARQUARDT, 1969; MARQUARDT, 1971; SEBRANEK und CASSENS, 1973).

2.3.3.2 Nitrosierbare Ausgangsstoffe

Veränderungen des ursprünglichen Gehalts von Pflanzen an nitrosierbaren Substanzen können durch mikrobiellen Abbau in Silage entstehen (GROSS und RIEBE, 1974), allerdings in größerem Umfang nur bei Fehlgärungen und besonders bei daraus resultierender Eiweißfäulnis. In für die Wiederkäuerfütterung verwendeten Futtermitteln tierischer Herkunft ist durch Erhitzung oder andere technologische Herstellungsverfahren mit einem gegenüber Grünfutter erhöhten Anteil an nitrosierbaren Verbindungen zu rechnen. So wurden in zubereiteten Fischen bis zu 260 mg/kg und in anderen Meerestieren bis zu 500 mg/kg

an Diäthylaminen nachgewiesen (MÖHLER et al., 1972). Nach EISENBRAND und MARQUARDT (1969) kommen Dimethylamin und Trimethylamin regelmäßig in Seefischen vor. Die in anderen tierischen Produkten nachgewiesenen Aminmengen liegen unter 10 mcg/kg.

2.3.4 Pansen

Die mit dem Futter und dem Trinkwasser (5 - 50 mg Nitrat/Liter gelten als normal, in Ausnahmefällen wurden bis zu 350 mg Nitrat nachgewiesen) aufgenommenen nitrosierenden Ausgangsstoffe der NA-Synthese werden von den Pansenmikroorganismen hauptsächlich über Nitrit und Ammoniak zu Stickstoff abgebaut.

Näheres über den Abbau dieser Stickstoffverbindungen in Abschnitt 2.4.4.

An nitrosierenden Agentien sind jedenfalls Nitrat, Nitrit und nitrose Gase zu finden. Nitrat und Nitrit werden neben dem Abbau gleichzeitig rasch und direkt aus dem Pansen resorbiert und gehen in die Blutbahn über (FARRA und SATTER, 1971; LEWIS, 1951; NAKAMURA et al., 1976), wo sie im Stoffwechsel abgebaut werden. Aus der Blutbahn gelangt Nitrat z.T. wieder in die Speicheldrüsen, in den Speichel (SIEBER und BLANC, 1978) und damit erneut in den Pansen.

2.3.5 Milch

2.3.5.1 Nitrosierende Ausgangsstoffe

Kuhmilch enthält normalerweise Nitrat in einem Bereich von 0,01 - 2 ppm (DAVISON et al., 1964; KISZA et al., 1974; MAHIEU et al., 1976; RESMINI und VOLONTERIO, 1973; SIEBER und BLANC, 1978; SUKEGAWA und MATSUMOTO, 1975). Dieser geringe Gehalt ist nach REMOND (1975) darauf zurückzuführen, daß im Pansen

der größte Teil des vorhandenen Nitrats durch Mikroorganismen in Nitrit und Ammoniak umgewandelt wird. Nitrit wird, wie auch Ammoniak, im Stoffwechsel umgesetzt. Die Milchdrüse stellt eine Barriere für den Übertritt von Nitrat aus dem Blut in die Milch dar. Dennoch ist bei erhöhtem Nitratanteil im Futter auch ein Anstieg des Nitratgehaltes der Milch festzustellen. Diese Meinung wird von DAVISON et al. (1964), KISZA et al. (1974), LEONHARD-KLUZ et al. (1974) aufgrund ihrer Versuchsergebnisse vertreten, während andere Autoren keinen Einfluß des Futternitrats auf den Gehalt der Milch an Nitrat feststellen konnten (HÄNNI, 1954; SEBAUGH et al., 1970). Die höchsten in der Literatur angegebenen Nitratgehalte sind 14,53 ppm in sterilisierter Milch nach RESMINI und VOLONTERIO (1973). Da es sich um sterilisierte und nicht um unbehandelte, rohe Milch handelt, besteht die Möglichkeit, daß Rückstände von in Molkereien verwendeten Reinigungsmitteln diese hohen Nitratwerte mitverursacht haben. MAHIEU et al. (1976) geben für frische Milch zwar eine von Jahr zu Jahr ansteigende Rate an überdurchschnittlich hohen Nitratgehalten (Dünger!) an, nehmen aber als Durchschnitt für Milch 1 ppm Nitrat an. Untersucht wurden für diese Angaben Sammelmilch aus Molkeereien und Stallgemelke. Für Sammelmilch war der höchste festgestellte Gehalt 3,35 ppm (siehe Tabelle A). Der Nitritgehalt von Milch wird von den genannten Autoren mit 0,01 - 1 ppm angegeben (siehe Tabelle B).

Tabelle A: Nitratgehalte in Milch und Milchprodukten

Sorte	Anzahl Proben	Gehalt an Nitrat (ppm)	Autor
Kuhmilch	40	5	DAVISON
Kuhmilch	24	0,66 - 1,7	HÄNNI
Kuhmilch	20	0,4 - 1,0	JOERIN
Kuhmilch			
Einzelmilch	244	0,3 - 2,0	MAHIEU
Mischmilch 1974	123	0,46 - 3,35	
Mischmilch 1975	65	0,76 - 1,65	
Kuhmilch	16	21	RAUTU
Milch	62	0,05 - 1,02	RESMINI
Kuhmilch	60	0 - 0,5	SIMON
Kuhmilch		0,9 - 2,2	SUKEGAWA
Milch, ster.	8	2,32 - 14,53	RESMINI

Tabelle B: Nitritgehalte in Milch und Milchprodukten

Sorte	Anzahl Proben	Gehalt an Nitrit (ppm)	Autor
Kuhmilch	244	1 - 0,1	MAHIEU
	188	1 - 0,1	MAHIEU
Kuhmilch	25	unter 0,01	RAMMELL
Kuhmilch		0,03	SUKEGAWA

Tabellen übernommen nach SIEBER und BLANC (1978)

2.3.5.2 Nitrosierbare Ausgangsstoffe

Für Milch wie für die meisten Lebensmittel werden Aminkonzentrationen von 1 - 10 ppm angegeben (SIEBER und BLANC, 1978). Nach SEBRANEK und CASSENS (1973) sind Kreatin und Kreatinin in Milch nachgewiesen worden. Von MEHTA et al. (1974) wurden Trimethylamin, Methylamin, Äthylamin, Propylamin, Butyl-Pentyl- und Hexylamin gaschromatographisch in Rohmilch nachgewiesen. WEIHRAUCH und SCHWARTZ (1974) fanden per Dünnschicht-Chromatographie n-Amylamin, Isobutylamin, Piperidin, Isopropylamin, Äthylamin, Pyrolidin, Dimethylamin und Methylamin in Molke.

2.4 Voraussetzungen für das Vorkommen bzw. die Entstehung von NA

2.4.1 Boden

Mit einer NA-Bildung im Boden ist prinzipiell zu rechnen, da Nitrit als Zwischenprodukt von Nitrifikation und Denitrifikation - allerdings in meist geringen Konzentrationen - vorliegt. Man kann ferner davon ausgehen, daß sekundäre Amine in geringer Konzentration in jedem landwirtschaftlich genutzten Boden (SANDER und SCHWEINSBERG, 1972) vorhanden sind, da sie Stoffwechselprodukte diverser Bakterien darstellen, die organische Materie, wie abgestorbene Pflanzenteile oder auch organischen Dünger, als Nahrung verwerten. Auch durch aufgebrachte Pestizide (Amide) kann sich der Anteil der nitrosierbaren Substanzen im Boden erhöhen (TATE und ALEXANDER, 1976). Falls es unter günstigen Voraussetzungen, wie geeigneter H-Ionenkonzentration und mikrobieller Tätigkeit, zu einer NA-Synthese kommt, sind jedoch sehr geringe Ausbeuten zu erwarten. Dazu wurden von DRESSEL (1976) in vitro-Versuche durchgeführt. Bodenproben wurden jeweils 300 ppm Nitrit sowie 300 ppm Methylamin und Diäthylamin zugesetzt, Mengen, die nach dem Autor allerdings im Freien nie vorkommen. Die NA-Ausbeute erreichte, variierend

mit dem pH-Wert des Bodens, nach zwei bis vier Tagen ihr Maximum. Nur aus 0,5% der Ausgangssubstanzen hatten sich NA gebildet! Die gebildeten NA nahmen vom vierten Tag an rasch wieder ab. Zu einer Synthese kam es nur im nicht sterilisierten Boden und in der Nähe des Neutralpunktes, was auf bakterielle Tätigkeit schließen läßt. Die Abnahme der NA im Boden beruht auf deren Wasserdampflichkeit wie auch auf mikrobiellem Abbau. Aus bewachsenem Boden verschwinden NA schneller als aus unbewachsenem (s. Abschnitt 2.4.2).

Nach einer anderen Arbeit von BUCHNER et al. (1973) sind im Boden vorhandene NA innerhalb von 8 Tagen bis zur Nachweisgrenze, die hier allerdings im ppm-Bereich liegt, abgebaut. SANDER und SCHWEINSBERG (1972) geben für einen ähnlichen Versuch ebenfalls geringe Ausbeuten an NA und einen gänzlichen Abbau nach 20 Tagen an. Nach derselben Zeit waren auch direkt in den Boden verabreichte NA abgebaut. Um die Möglichkeit einer NA-Synthese nach Anreicherung des Bodens mit nitrosierbaren Substanzen zu testen, wurden Böden mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel Methylcarbamat behandelt und anschließend untersucht, ob in Anwesenheit von Nitrit eine NA-Synthese stattgefunden hatte. Es waren zwar NA festzustellen, jedoch war auch hier die Ausbeute gering und die gebildeten NA "relativ instabil". Somit ist die Akkumulation von NA im Boden auszuschließen.

2.4.2 Pflanzen

Über die Fähigkeit mancher Pflanzen, Nitrat zu speichern, ist schon berichtet worden (Abschnitt 2.3.2). Die Frage entsteht, ob dabei von den Pflanzen auch NA synthetisiert werden können. Die Voraussetzungen dafür wären Nitrit und nitrosierbare Agentien in genügender Konzentration in den Pflanzen. Nitrit kommt nach DRESSEL (1976) und SCHUPHAN (1969) in intakten, lebenden Pflanzen nur in Spuren vor, was mit der höheren Aktivität der

Nitritreduktase gegenüber der Nitratreduktase zusammenhängt. Nitritfunde in Pflanzen hängen mit Vorgängen nach dem Schnitt zusammen. Berichte aus früheren Jahren über NA in Pflanzen sind höchstwahrscheinlich auf Artefakte zurückzuführen (DRESSEL, 1976). Bei einer Konzentration von Nitrit und sekundären Aminen von 1 - 5 ppm würde bei einer Nitrosierung die Ausbeute ca. 0,01% der Ausgangssubstanzen ausmachen. Um festzustellen - die unbewiesene Möglichkeit einer NA-Synthese vorausgesetzt - was mit NA in Pflanzen geschieht, wurden Dimethylnitrosamin (DMNA) und Diäthylnitrosamin (DÄNA) in Pflanzen injiziert. Nährlösung (die Pflanzen wurden in Wasserkultur gehalten) und Wurzeln blieben frei von NA; diese wurden nur vier Tage lang in den oberirdischen Pflanzenteilen nachgewiesen (DRESSEL, 1973). Weitere Versuche ergaben, daß NA, die dem Boden versuchshalber zugesetzt worden waren, in den Pflanzen genauso lange nachzuweisen waren wie im Boden und daß NA aus bewachsenem Boden schneller verschwinden als aus unbewachsenem. Daraus läßt sich folgern, daß erstens Pflanzen in der Lage sind, NA über die Wurzeln aufzunehmen und per Transpiration wieder abzugeben (BUCHNER et al., 1973; DRESSEL, 1973; SANDER und SCHWEINSBERG, 1972), und daß zweitens die schnellere Abnahme der NA-Gehalte in bewachsenem Boden mit dessen höherem Wasserdurchsatz zusammenhängt. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß NA in Pflanzen nicht synthetisiert werden und in lebenden Pflanzen normalerweise nicht vorkommen (SANDER und SCHWEINSBERG, 1972; SANDER et al., 1974). Dies geht vor allem aus einer neueren Arbeit von DRESSEL (1976) hervor, in der, bei veränderter Nachweisttechnik, frühere Befunde über NA in Weizen widerlegt wurden (BUCHNER et al., 1973; DRESSEL, 1973).

2.4.3 Zubereitetes Futter

2.4.3.1 Silage

Geht man von der Voraussetzung aus, daß in geernteten Futterpflanzen keine NA vorhanden sind, so hat man mit beginnender

Silierung der Pflanzen bis zu ihrer Verfütterung mit einer breiten Zahl von Faktoren zu rechnen, die deren Entstehung beeinflussen können. Deshalb zunächst ein kurzer Überblick in Anlehnung an die Vorgänge bei der Herstellung von Gärfutter (GROSS und RIEBE, 1974; WIESNER et al., 1970).

Das Ziel der Silageherstellung ist ein Futter, das bei optimaler Erhaltung von Nährwert und Vitaminen über längere Zeit lagerfähig bleibt. Voraussetzung dazu ist eine zügig verlaufende Vermehrung von Milchsäurebildnern (Laktobazillen) in der frischen Silage. Schon nach drei Tagen sinkt durch die entstehende Milchsäure der pH-Wert im Pflanzenmaterial so weit (pH 3 - 5), daß die für die Silierung unerwünschten, stets vorhandenen Bakterienarten, aber auch Laktobazillen, ihre Aktivitäten einstellen oder absterben. Ebenso werden proteinabbauende, pflanze-eigene Enzyme gehemmt. Mangelhafte Milchsäurebildung ist die Folge von

1. zu geringem Zuckergehalt oder hohen Rohproteingehalten (Pufferwirkung) im Futter (Folge von Witterungseinflüssen),
2. Zuckermangel für die gewünschten Milchsäurebildner, hervorgerufen durch Vergärung desselben durch konkurrierende, luftliebende Gärungsschädlinge,
3. zu hohen Temperaturen im Gärfutter (Außentemperatur!),
4. einer Entwicklung ungeeigneter Laktobazillen (Essigsäurebildner),
5. schleichendem Milchsäureabbau durch Gärungsschädlinge bei unkontrolliertem Luftzutritt.

Bei mangelhafter Milchsäuregärung ist in jedem Falle damit zu rechnen, daß andere unerwünschte Bakterien oder auch Hefen, die auf den geernteten Pflanzen ohnehin in größerer Zahl als die Milchsäurebildner vorhanden sind, aufkommen und eine oder mehrere der folgenden Änderungen in der Silage bewirken:

1. Abbau der Milchsäure
2. Hebung des pH-Wertes
3. Entstehung von Wärmeenergie
4. Eiweißabbau
5. Entstehung von NH_3 aus dem Eiweißabbau (bis zu 50% des vorhandenen Eiweißes).

Diese Vorgänge können bei nicht ordnungsgemäßer Milchsäurebildung gleich zu Beginn der Gärung auftreten, sie können aber auch bei gehäuftem Auftreten von Laktobazillusarten, die mangels anderer geeigneter Nahrung (Zucker) Milchsäure abbauen, oder anderen Störungen nach längerer Zeit in Gang kommen. Man bezeichnet das als "Umkippen" der Silage. Während bei normalem Gärungsverlauf nur ein geringer Nitratabbau (30%) über Nitrit, nitrose Gase und Ammoniak stattfindet, wird dieser Prozeß bei Fehlgärungen forciert. Daneben entstehen auch Kohlensäure-, Methan- und Wasserstoffgas. Bei Fehlgärungen mit daraus resultierender Fäulnis entstehen im Zuge des Eiweißzerfalls Amine, Diamine, höhere Alkohole sowie Schwefelwasserstoff.

In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der lebenden Pflanzen, speziell dem Gehalt an Nitrat, Ascorbinsäure (BERGNER, 1970), Halogenid- oder Rhodanidionen sowie dem Gärungsverlauf in der Silage ist eine NA-Synthese grundsätzlich möglich, muß aber nicht zwangsläufig stattfinden.

Nitrit und Nitrat finden auch Verwendung als Silierzusatz. Nitrit nämlich wirkt nahezu selektiv hemmend auf gärungsschädliche Mikroben, außerdem entstehen in seiner Anwesenheit auch Essigsäure und Ameisensäure, die eine pH-Senkung bewirken. Sowohl bei Nitrit- als auch bei Nitratzusatz entstehen vermehrt nitrose Gase. Bei Zusatz von Nitrit über einen Zeitraum von 18 Tagen, bei Nitratzusatz über längere Zeit entstehen die bekannten Abbauprodukte. Folgende Ergebnisse über die Untersuchung von Silagen auf das Vorhandensein von NA liegen vor: TATE und ALEXANDER (1976) hatten für einen in vitro-Versuch einen Teil der Proben

mit Nitrat versehen und siliert. In keiner der Proben waren NA vorhanden, allerdings lag die Nachweisgrenze im ppm-Bereich. Bei den von TERPLAN et al. (1978) durchgeführten Untersuchungen waren von insgesamt 10 Proben fünf positiv und enthielten 3 - 33 ppm DPNA und DÄNA. MÖHLER und HALLERMAYER (1974) fanden in Grassilage keine NA, in fünf untersuchten Proben von Mais-silage aber DÄNA und DPNA in Mengen von 10 mcg/kg.

2.4.3.2 Futtermittel tierischer Herkunft

NA wurden als Ursache von Vergiftungsfällen bei Wiederkäuern nach Verfütterung von Heringsmehl gefunden, das mit ungewöhnlich hohen Nitritmengen konserviert war. Wie schon unter 2.3.3.2 erwähnt, enthält Fisch Amine in weitaus höherer Konzentration als die übrigen bisher untersuchten Lebens- und Futtermittel. Nach ENDER und CEH (1968) reagiert Nitrit schon bei Temperaturen unter 0°C mit Dimethylamin und Trimethylamin unter Bildung von DMNA, einem äußerst karzinogenen NA. Besagtes Heringsmehl enthielt die extrem hohe Konzentration von 30 - 100 ppm DMNA (SEBRANEK und CASSENS, 1973).

2.4.4 Pansen

Die zahlreichen Faktoren einer möglichen NA-Synthese in Silage kommen auch für etwaige Nitrosierungsreaktionen im Pansen in Betracht. Die durch ein enormes Potential an Mikrolebewesen bewirkte Vormagenverdauung sowie die Resorption wasserlöslicher Stoffe aus dem Pansen direkt in die Blutbahn und die Abgabe gasförmiger Stoffe durch den Ruktus schaffen komplizierte Voraussetzungen. Zunächst seien dazu einige Angaben über die Pansenphysiologie referiert.

SCHEUNERT und TRAUTMANN (1965): "Pansen und Haube stellen ein anaerobes, meist leicht saures, aber gepuffertes System dar (pH 5,8 - 7,5), das bei optimaler Temperatur (39° - 40°C) und

dauernder Nahrungszufuhr die besten Voraussetzungen für Wachstum, Stoffwechsel und Fortpflanzung zahlreicher Arten von Mikroorganismen bildet. Folgende Bakterienarten sind vertreten: Laktobazillen, Streptokokken, Bakteroidesarten, Clostridien, Selenomonaden, Vibrionen, Mikrokokken und Sarcinen. Neben diesen, hauptsächlich Kohlenhydrate angreifenden Bakterien, sind in der Minderzahl Bakterien der Coli (*E. coli*, *Aerobakter*) und *Subtilis*gruppe vertreten, die Eiweißfäulnis verursachen. Neben den Bakterien existiert noch eine erhebliche Menge von Infusorien im Panseninhalt."

Bestimmte Bakterien- und Protozoenarten, an Zahl wesentlich geringer als die Kohlenhydratvergärer, sind der schnellen Proteolyse der in der Nahrung enthaltenen Eiweißkörper fähig. Dies geschieht unabhängig von der Nahrungsart bei einem pH-Optimum von 6 - 7. Dabei entstehen Peptide, Aminosäuren sowie Ammoniak durch Desaminierung vor allem von Glutaminsäure, Alanin und Asparaginsäure.

Neben der Eiweißspaltung und Biosynthese aus Aminosäuren findet eine Verwertung von stickstoffhaltigen Verbindungen des Futters, die keinen Eiweißcharakter besitzen, über die Pansenmikroorganismen statt, indem der Stickstoff zum Aufbau von Eiweiß mit-herangezogen wird.

Für das aus Trinkwasser, pflanzlichen und anderen Futtermitteln aufgenommene Nitrat werden von WIESNER et al. (1970) folgende Abbaumöglichkeiten angegeben: 1. Mikrobielle Bildung von Nitrit, Hydroxylamin und Ammoniak durch Denitrifizierung, 2. chemische Reaktion (van Slyke-Reaktion) der Aminogruppen der Aminosäuren mit Nitrit unter Bildung von Stickstoff. Die hauptsächlichsten Endprodukte, gasförmiger Stickstoff oder Ammoniak, hängen nach FARRA und SATTER (1971) von der jeweiligen Aktivität verschiedener Mikroorganismen ab. In Gegenwart von Glukose z.B. erhöht sich die Rate des zu Ammoniak umgewandelten Nitrats.

Nach Angabe diverser Autoren findet man aus Nitrat abgebautes Nitrit wie auch im weiteren Verlauf des Abbaus gebildetes Ammoniak sehr rasch im Blut (LEWIS, 1951; WANG et al., 1961). Wird Kaliumnitrat durch eine Pansenfistel oder Schlundsonde verabreicht, so entsteht nach drei Stunden ein maximaler Spiegel im Blut der Tiere. Gebildetes Nitrit wird anscheinend z.T. sofort aus den Vormägen resorbiert, während es zum anderen Teil weiter abgebaut wird zu Ammoniak, das ebenfalls aus den Vormägen resorbiert wird. Von NAKAMURA et al. (1976) und WANG et al. (1961) wird auch beschrieben, daß Fälle von Nitritvergiftung bei tagelanger Verabreichung gleichbleibender Nitratmengen erst nach einigen Tagen auftreten, weil die Pansenmikroorganismen nach einer Gewöhnungsphase an das nitratreiche Futter Nitrat immer rascher zu Nitrit reduzieren und somit zunehmend Nitrit gebildet und resorbiert werden kann.

Wird Nitrat in Form von extrem stark gedüngtem Futter verabreicht, erfolgt der Nitritanstieg über längere Zeit (sechs Stunden), was damit zu erklären ist, daß die Nahrung erst aufgespalten werden muß, um Nitrat den Mikroorganismen zugänglich zu machen (NAKAMURA et al., 1976). Begünstigend für eine NA-Synthese im Pansen ist das leicht saure Milieu, die Temperatur sowie die Anwesenheit von Bakterienstämmen, die als zur NA-Synthese befähigt beschrieben werden. Nitrosierende und nitrosierbare Reaktionspartner sind in genügendem Maße vorhanden. Angaben für die NA-Synthese im Wiederkäuermagen gibt es in der Literatur nicht. Für den einhöhligen Magen wird anhand von in vitro- und in vivo-Versuchen angegeben, daß unter bestimmten Umständen (Subazidität, bakterielle Besiedlung) eine NA-Synthese möglich ist (FINE et al., 1977; GREENBLATT und MIRVISH, 1973; SANDER, 1968 und 1973; SANDER und BÜRKLE, 1969; SANDER und SEIF, 1969; SCANLAN, 1975; SEN et al., 1969). Die Wahrscheinlichkeit, daß auch im Wiederkäuermagen NA gebildet werden, ist bei den genannten Voraussetzungen groß. Falls aber NA im Pansen vorhanden sind, sei es mit dem Futter aufgenommen oder im Pansen synthetisiert, erhebt sich die Frage, was weiter mit ihnen geschieht.

Mehrere Möglichkeiten sind vorstellbar:

1. Abbau durch Mikroorganismen,
2. Abgabe der wasserdampfllüchtigen NA durch den Ruktus,
3. Resorption der NA aus dem Pansen in die Blutbahn und Abbau im Stoffwechsel (Leber) bzw. Ausscheidung mit Körpersekreten und Exkreten,
4. Weiterbeförderung mit dem Nahrungsbrei und Resorption bzw. Ausscheidung aus dem Darm (SANDER und SCHWEINSBERG, 1972).

Nach einem Versuch von JUSZKIEWICZ und KOWALSKI (1973) - allerdings mit extrem hohen Dosen von NA - ist der dritte Weg der wahrscheinlichste: Ziegen wurden über eine Schlundsonde subletale Dosen von DMNA, DÄNA und Dipropylnitrosamin (DPNA) verabreicht. Verhältnismäßig große Mengen der verabreichten NA gingen rasch in das Blut über, wo sie schon nach einer Stunde ihr Maximum erreichten.

2.4.5 Milch

Berichte über Untersuchungen von Milch auf das Vorhandensein von NA existieren nur in sehr geringer Anzahl. REINECCIUS und COULTER (1972) untersuchten verschiedene Proben von Trockenmilch, konnten aber keine NA feststellen. HEDLER und MARQUARDT (1968) fanden in einer untersuchten Milchprobe NA. Der Nachweis erfolgte allerdings nach einer nicht mehr als zuverlässig erachteten Methode. Unter mehreren Milchproben, die von TERPLAN et al. (1978) untersucht wurden, fanden sich in zweien NA (je 1 ppb DÄNA). Eine der Proben war bereits verdorben. Sämtliche Extrakte waren über ein Jahr gelagert.

Für das Vorhandensein von NA in Milch gibt es zwei Erklärungen:

1. NA werden aus dem Pansen resorbiert und gelangen aus der Blutbahn in die Milch. Dies geht aus dem Versuch von JUSZKIEWICZ und KOWALSKI (1973) hervor: Laktierenden Ziegen wurden subletale Dosen von DMNA, DÄNA und DPNA über eine

Sonde verabreicht und in der Folge Blut- und Milchproben in Stundenabständen entnommen und untersucht. Die Werte der verschiedenen NA differierten etwas untereinander, doch ergab sich nach ein bis zwei Stunden ein Maximum von NA im Blut, nach zwei Stunden in der Milch. Erste Spuren von NA waren schon nach 30 Minuten in der Milch festzustellen. Nach Angabe der Autoren wurden die verabreichten NA rasch resorbiert und gelangten in einem Umfang von 0,15 - 0,85% in die Milch der Tiere. MOHR et al. (1972) berichten ähnliche Ergebnisse von Versuchen mit laktierenden Goldhamstern.

2. Es ist vorstellbar, daß NA in der Milch nach dem Melken entstehen, entweder durch mikrobielle Aktivität (Nitratreduktion oder Katalyse) oder durch eine Reaktion vorhandener Präkursoren (Nitrit und Amine) beim Erhitzen der Milch. Bei vorhandenen Mengen an Nitrat und Aminen und bei entsprechendem mikrobiellem Wachstum wäre also auch in Milch eine geringgradige NA-Synthese vorstellbar. Auch hierbei ist teils mit katalysierenden und teils mit hemmenden Faktoren zu rechnen. Neben Rhodanid, das mit Futterpflanzen aufgenommen und auch über das Euter ausgeschieden wird (SCHWEINSBERG, 1974), enthält Milch ca. 15 mg/kg Ascorbinsäure (SANDER, 1973), die allerdings beim Erhitzen weitgehend zerstört wird. FAN und TANNENBAUM (1973 a und b) berichten in zwei Arbeiten von einer nicht näher erklärten Hemmung der Nitrosierungsreaktion in gelöster Trockenmilch, verglichen mit der gleichen Reaktion in Pufferlösung.

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material

3.1.1 Untersuchung von Futter, Panseninhalt und Milch

3.1.1.1 Futtermittel

Untersucht wurden Rübenblatt, Heu und drei verschiedene Silagen. Das Rübenblatt wurde täglich von Hand geerntet, frisch verfüttert und ca. zwei Stunden nach der Ernte auf die enthaltenen Mengen an Nitrat, Nitrit und NA untersucht. Da das Rübenblatt zusammen mit Heu verfüttert wurde, wurde auch dessen Nitrit- und Nitratkonzentration festgestellt, um eine Vorstellung von der gesamten mit dem Futter aufgenommenen Nitratmenge zu bekommen.

Für die Untersuchung des Nitrit- und Nitratgehaltes wurden je 3 g Probenmaterial verwendet, für die NA-Analyse betrug die Einwaage 200 g, als NA-Standard wurden 30 mcg DPNA zugegeben.

Insgesamt 14 Proben von drei verschiedenen Silagen (angewelkte Rübenblatt-Maissilage, Maissilage und Rübenblattsilage) wurden auf NA untersucht. Bei der Rübenblatt-Maissilage und der Rübenblattsilage wurden auch Nitrit- und Nitratgehalt festgestellt. Das Probenmaterial wurde zur Fütterungszeit aus dem frischen Anstich entnommen und unmittelbar danach bis zur Verarbeitung bei -18°C eingefroren. Von der Rübenblatt-Maissilage wurden in der Zeit von Mitte Dezember bis Ende Januar fünf Proben, von der Maissilage acht Proben zwischen Mitte Dezember und Ende Februar untersucht. (Mitte Dezember waren die Silagen fertig vergoren und verfütterbar.) Eine einzelne Probe stammte von verdorbener Rübenblattsilage zu Ende der Silagefütterungsperiode (Ende Februar). Für die Nitrit- und Nitratuntersuchung wurden je 3 g, für die NA-Analyse je 200 g Material verwendet. Standard: 50 mcg Diisopropyl-NA (DIPNA).

3.1.1.2 Panseninhalt

Von insgesamt elf Proben wurden jeweils Nitrit-, Nitrat- und NA-Gehalt festgestellt. Sieben Proben stammten aus einem Fütterungsversuch mit frischem Rübenblatt und Heu (Nitrit-, Nitrat- und NA-Konzentrationen bekannt, siehe 3.3.1.1). Dazu erhielt eine Pansenfistelkuh sechs Tage lang 25 kg Rübenblatt und 5 kg Heu pro Tag, verteilt auf zwei Mahlzeiten. Jeweils sechs Stunden nach Beginn der Fütterung wurde Pansensaft durch die Fistel abgepumpt, in verschließbare Gefäße gegeben und bis zur Verarbeitung eingefroren. Zur NA-Analyse wurden je 300 g Pansensaft verwendet (50 mcg DPNA als Standard), zur Nitrit- und Nitratanalyse 100 g pro Untersuchung.

Vier Proben wurden aus Panseninhalt von Schlachtbullen entnommen, die u.a. mit nicht näher untersuchter Maissilage gemästet worden waren. Die Proben wurden jeweils unmittelbar nach der Eröffnung des Pansens entnommen und z.T. frisch, z.T. nach Tiefgefrierung untersucht. Zur Nitrit-Nitratuntersuchung wurden je 3 g verwendet, zur Untersuchung auf NA je 200 g (Standard 50 mcg DPNA).

3.1.1.3 Milch

Untersucht wurden insgesamt 17 Proben aus Einzelgemelken. Die Kühe wurden mit der ebenfalls untersuchten Rübenblatt-Maissilage gefüttert. Milch- und Silageproben wurden jeweils am gleichen Tag entnommen. Neben der Ermittlung des Gehaltes an Nitrit und Nitrat in der Milch von Einzeltieren sollte festgestellt werden, ob bei einem eventuellen Auftreten von NA in der verfütterten Silage oder allein durch den hohen Nitratgehalt des Futters (Bildung von NA im Pansen) NA in die Milch gelangen oder bei Vorhandensein von Nitrat in der Milch dort gebildet werden können.

Die Nitrit- und Nitratgehalte der 17 Milchproben wurden jeweils am Tag der Entnahme, die Nitritgehalte von acht dieser Proben nach drei Tagen Lagerung und von fünf Proben nach fünf Tagen Lagerung ermittelt, um eine Änderung der Nitrit- und Nitratkonzentration feststellen zu können (bakterielle Tätigkeit). Aufbewahrt wurden die Milchproben im Kühlschrank bei 6°C. Stichproben wurden ebenfalls am 1., 3. und 5. Tag auch nach Erhitzung auf 100°C untersucht.

Für die o.a. Untersuchungen wurden jeweils 10 g Milch eingewogen. Drei der 17 Milchproben wurden zur NA-Analyse verwendet. Eine davon wurde roh am 1. und 3. Tag sowie gekocht am 5. Tag untersucht. Die zweite wurde am 1. Tag roh sowie am 4. Tag roh und gekocht untersucht. Eine dritte wurde am 1. Tag gekocht und untersucht.

Gekocht wurde die Milch für 10 Minuten im Rückflußkühler, um ein Entweichen der wasserdampfgefährlichen NA zu vermeiden. Zur NA-Analyse wurden jeweils 400 g Milch mit einem Standard von 50 mcg DIPNA destilliert.

3.1.2 Untersuchungen zum Verbleib von NA im Panseninhalt

3.1.2.1 Verabreichung von NA an laktierende Rinder

Der Versuch wurde mit Tieren des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim durchgeführt. Fünf Tage lang wurden zwei laktierenden Kühen zweimal täglich 5 mg DANA verabreicht. Diese Dosis entspricht etwa dem dreifachen der bisher in Silage festgestellten, höchsten NA-Konzentration, berechnet auf eine angenommene - Menge von 50 kg Silage pro Mahlzeit (einer überreichlich bemessenen Silageportion). Diese gegenüber tatsächlich in Silage gefundenen NA-Gehalten überhöhte Dosis wurde gewählt, um sowohl den Nachweis der verabreichten NA in Pansensaft und Milch zu erleichtern als auch die Situation bei

der Verfütterung von NA-haltiger Silage möglichst genau nachzustellen, da die Möglichkeit zu bedenken war, daß geringe NA-Dosen sich im Stoffwechsel anders verhalten als sehr hohe Dosen. Die genannte Menge DÄNA wurde in einem Liter gekühlten Brunnenwassers gelöst und den Tieren aus einer Flasche eingeschüttet.

Vor Versuchsbeginn wurde jedem der Tiere - mittels Entnahmegerät nach DIRKSEN - Pansensaft zur Analyse entnommen, um NA bei den gegebenen Fütterungsbedingungen ausschließen zu können. Milchproben wurden während der Dauer des Versuchs jeweils aus dem Abendgemelk entnommen (die beiden ausgewählten Tiere waren kurz vor dem Trockenstellen und gaben noch jeweils acht Liter Milch). Am letzten Versuchstag wurde bei beiden Tieren eine Stunde und drei Stunden nach der NA-Verabreichung Pansensaft entnommen.

Sowohl die Milch- als auch die Pansensaftproben wurden sofort nach der Entnahme in dicht schließende Behälter abgefüllt und gekühlt. War aus zeitlichen Gründen eine Weiterverarbeitung am nächsten Tag ausgeschlossen, so wurde das Probenmaterial ca. eine Stunde nach der Gewinnung eingefroren. Jeweils 150 g des Materials wurden zur NA-Analyse verwendet unter Zusatz von 3 mcg DPNA als Standard. Nitrit- sowie Nitratgehalte wurden in diesem Versuch nicht untersucht.

3.1.2.2 In vitro-Versuch mit Pansensaft vom Schaf

Der für diesen Versuch benötigte Pansensaft wurde einem Pansenfistelschaf des Institutes für Physiologie des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München entnommen. Der Pansensaft wurde jeweils zur gleichen Tageszeit - ca. fünf Stunden nach der Fütterung des Tieres - mittels Saugflasche gewonnen und sofort in ein auf 39,5°C vorgewärmtes Thermosgefäß gegeben.

Eine Abkühlung sollte vermieden werden, um die biologische Aktivität des Materials nicht zu beeinträchtigen. Danach wurde der Pansensaft in einen vorgewärmten 1-Liter-Rundkolben überführt, der mit CO_2 gefüllt worden war, um ein anaerobes System vorzugeben. Anschließend wurde im Schüttelbrutschrank bei $39,5^\circ\text{C}$ inkubiert. Zur Untersuchung auf NA wurden jeweils Doppelproben à 100 ml verwendet.

Die erste Doppelprobe wurde ohne Zusatz von DÄNA und ohne vorherige Bebrütung analysiert, um einen etwaigen ursprünglichen Gehalt an NA festzustellen. Die folgenden Proben wurden nach Zugabe von 100 mcg DÄNA zwei, vier und sechs Stunden bebrütet und anschließend, jeweils unter Zugabe von 50 mcg DPNA als Standard, destilliert und weiterverarbeitet.

In diesem Versuch sollte festgestellt werden, wie sich NA im Panseninhalt, insbesondere unter dem Einfluß von Pansenmikroorganismen, und zeitabhängig verhalten.

3.1.3 Modellversuche zur Bildung von NA in Milch

Verwendet wurde für die folgenden Versuche Sammelmilch (aus ungefähr 400 Betrieben) einer Münchner Molkerei. Die Milchproben - jeweils zwei Liter - wurden aus dem Kühlbehälter der Molkerei entnommen.

Von jeder der insgesamt sieben Proben wurde zunächst der ursprüngliche Gehalt an Nitrit und Nitrat ermittelt und anschließend die Milch in drei Portionen geteilt. Der erste Teil blieb unbehandelt, der zweite und dritte Teil wurde mit Nitrat versetzt, und zwar so, daß Konzentrationen von einmal etwa 2 mcg pro 100 g und zum anderen etwa 5 mcg pro 100 g vorlagen.

Die so behandelten Proben wurden für 15 Stunden bei 10°C im Kühlschrank aufbewahrt. Anschließend wurde bei allen Probenteilen wieder der Nitritgehalt ermittelt. Stichproben wurden bei gleichen Lagerbedingungen noch einmal am dritten Tag getestet.

Für die Analyse des Nitrit- und Nitratgehaltes wurden je 10 g Milch verwendet. Zwei dieser Proben wurden nach ebenfalls 15 Stunden Lagerung bei 10°C auf NA geprüft. Verwendet wurde dazu jeweils der naturbelassene sowie der auf annähernd mcg Nitratgehalt eingestellte Teil der Proben. Alle wurden für eine Minute im Autoklaven auf 120°C erhitzt und 400 ml davon nach der Abkühlung mit einem Zusatz von 50 mcg DIPNA als Standard destilliert.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden bei frisch ermolkenen und sofort gekühlter Milch nach ca. vier Stunden die ursprünglichen Nitrit- und Nitratgehalte festgestellt. Anschließend wurden der Milch ca. 0,5 ppm Nitrit zugesetzt. Ein Teil der Milch wurde dann 10 Minuten im Rückflußkühler gekocht, der andere Teil im Autoklaven erhitzt, so daß für etwa eine Minute Temperaturen von 120°C erreicht wurden. Anschließend wurden sowohl von der gekochten als auch von der autoklavierten Milch erneut die Nitrit- und Nitratgehalte ermittelt.

Jede der insgesamt vier Milchproben wurde auf den Gehalt an NA untersucht, und zwar in gekochtem wie auch in autoklaviertem Zustand. Unmittelbar nach dem Abkühlen wurde unter Zusatz von 50 mcg DIPNA als Standard destilliert.

Diese Versuche sollten klären,

- a) ob bei hohem Nitratgehalt der Milch und bei üblicher Aufbewahrungstemperatur durch bakterielle Tätigkeit so viel Nitrat zu Nitrit reduziert wird, daß eine NA-Synthese möglich wird, und
- b) ob durch Erhitzen eine NA-Synthese bewirkt bzw. gefördert wird.

3.2 Methodik

Für sämtliche Untersuchungen wurden Milch und Pansensaft in ihrer ursprünglichen Beschaffenheit ohne weitere Vorbereitung

verwendet. Panseninhalt, Heu, Rübenblatt und Silage wurden, falls nötig, manuell dann im Mixer feinzerkleinert und anschließend gelegentlich mit dem Ultra-Turrax homogenisiert.

3.2.1 Nitrit-Nitratbestimmung

Verwendet wurde das kolorimetrische Verfahren nach FOLLET und RATCLIFF (1963), kombiniert mit der Eiweißklärung nach CARREZ. Bei diesem Verfahren erfolgt die Bestimmung des Gehalts von Untersuchungsmaterial an freiem Nitrit bzw. durch Cadmiumschwamm zu Nitrit reduzierten Nitrats über Bildung eines Diazofarbstoffs. Die Konzentration dieses Farbstoffes kann photometrisch bestimmt werden. Die Messungen wurden am ZEISS-Spektral-Photometer PM6 bei 525 nm durchgeführt.

Die durch Anwendung dieses Verfahrens ermittelten Ergebnisse waren nicht einwandfrei reproduzierbar. Es wurden deshalb im allgemeinen vier bis sechs Parallelproben angesetzt und untersucht. Der daraus sich ergebende Mittelwert war mit minimalen Schwankungen reproduzierbar.

3.2.2 NA-Analytik

Das Vorbereiten der Proben zur NA-Analyse geschah in Anlehnung an das Verfahren nach TELLING (1972) und EISENBRAND et al. (1975). Die mit Wasser, NaCl und K_2CO_3 zerkleinerten Proben wurden bei 55°C vakuumdestilliert, mit Dichlormethan extrahiert und nach Trocknung über Na_2SO_4 zunächst im KUDERNA-DANISH-Verdampfer, dann unter strömendem Stickstoff auf 1 ml eingeeengt.

Die Milch- und Pansensaftproben aus dem unter Punkt 3.1.2.1. erläuterten Versuch wurden nach einer etwas veränderten Methode (FINE et al., 1977) zubereitet. Das Probenmaterial wurde mit Paraffin und NaOH bei 110° bis 120°C vakuumdestilliert, zu-

nächst mit Hexan, dann mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die Weiterverarbeitung entspricht der o.a. Methode.

Die kombinierte gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung (GC-MS) wurde von Herrn Kalbfus von der Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung am VARIAN CH5DF 1400 (Auflösungsvermögen 4000) durchgeführt. Die Identifizierung der einzelnen NA erfolgte durch Single Ion Detection an den jeweiligen Molekülonen und zur Überprüfung an signifikanten Fragmentationen. Es wurden Diäthyl-NA (DÄNA), Diisopropyl-NA (DIPNA), Dipropyl-NA (DPNA) und Dibutyl-NA (DBNA) sowie Nitrosopyrrolidin (NPy) und Nitrosopiperidin (NPi) erfaßt. Dimethyl-NA (DMNA) wurde bei diesem Verfahren nicht erfaßt. Mit Hilfe eines Thermal Energy Analyzer (TEA) wurden bei einigen Proben Vergleichsuntersuchungen vorgenommen, wobei auch DMNA nachzuweisen war.

3.3 Ergebnisse und deren Besprechung

3.3.1 Nitrit-, Nitrat- und NA-Gehalte von pflanzlichen Futtermitteln und Panseninhalt geschlachteter und lebender Tiere sowie in roher und erhitzter Milch

3.3.1.1 Pflanzliche Futtermittel

Die Ergebnisse der Untersuchungen von frischem Rübenblatt, Heu und Silagen sind in Tabelle I zusammengefaßt.

Tabelle I: Gehalt der untersuchten Futtermittel an Nitrit,
Nitrat und NA

Proben- anzahl	Art des Futters	Zeitpunkt d.Gewinnung	Nitrit ppm	Nitrat ppm	NA
1	frisches Rübenblatt		6,5	270,1	0
1	Heu		3,0	262,4	n.d.
5	Rübenblatt- Maissilage angewelkt	15.12.	0,1	71,3	0
		20.12.	0,1	63,7	0
		4. 1.	0,2	70,7	0
		10. 1.	0	17,2	0
		23. 1.	0,1	44,5	0
1	Rübenblatt- silage (verdorben)	27. 2.	0	5,3	0
8	Maissilage	18.12.	n.d.	n.d.	0
		25.12.	n.d.	n.d.	0
		8. 1.	n.d.	n.d.	0
		17. 1.	n.d.	n.d.	0
		29. 1.	n.d.	n.d.	0
		5. 2.	n.d.	n.d.	0
		27. 2.	n.d.	n.d.	0
		6. 3.	n.d.	n.d.	0

Zeichenerklärung: n.d. = nicht durchgeführt

0 = kein Gehalt festgestellt

Bei den Silagen wurde auch der Zeitpunkt der Probengewinnung angegeben, da die Möglichkeit zu beachten war, daß nur temporär

NA gebildet werden. Das Rübenblatt liegt mit einem Nitratgehalt von 270 ppm noch im Bereich der für Grünfütter als normal geltenden Nitratkonzentration bis zu 300 ppm. Bei dem Vergleich von Rübenblatt mit Heu ist die relativ hohe Konzentration in Heu durch den Trocknungsprozeß zu berücksichtigen. Verglichen mit diesen Werten weisen die auf Nitrit- und Nitratgehalt untersuchten Silagen deutlich geringere Nitratwerte auf, auch Nitrit ist (in den Silagen) nur in Spuren feststellbar. Die Nitratwerte sprechen für einen Nitratabbau während der Hauptgärungsphase nach dem Einsilieren der Blätter. Gegen Ende der Silageverfütterung ist eine weitere Tendenz zur Abnahme der Nitrit- und Nitratwerte zu erkennen.

Alle Proben erwiesen sich als NA-frei. Für die unter Punkt 3.3.1 und Punkt 3.3.2.2 angeführten Untersuchungen lag die Nachweisgrenze für NA - in den auf 1 ml eingeeengten Extrakten aus den Probenmaterialien - bei 1 mcg/ml. Die Recovery betrug für sämtliche NA-Untersuchungen 60 - 80%.

3.3.1.2 Panseninhalt geschlachteter und lebender Tiere

Mit frischem Rübenblatt und Heu, deren Nitrit- und Nitratwerte in Tabelle I wiedergegeben sind, wurde sechs Tage lang eine Pansenfistelkuh gefüttert. Täglich einmal, jeweils etwa sechs Stunden nach der Fütterung, wurde Pansensaft zur Untersuchung entnommen und auf Nitrit, Nitrat und NA untersucht. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle II zusammengefaßt.

Tabelle II: Nitrit-, Nitrat- und NA-Gehalte im Pansensaft einer mit Rübenblatt und Heu gefütterten Kuh

Tag nach Beginn der Fütterung	Nitrit ppm	Nitrat ppm	NA ppb
0	0,1	0,2	0
1	0,2	0,2	0
2	0,2	0,3	0
3	0,1	0,3	0
4	0,1	0,3	DA NA < 3
5	0	0,2	DA NA < 3
6	0,1	0,2	0

Eine Versuchsdauer von sechs Tagen wurde gewählt, da die Pansenmikroorganismen drei bis fünf Tage zur Anpassung an nitratreiches Futter benötigen. Die Probennahme nach jeweils etwa sechs Stunden erfolgte im Hinblick auf das Maximum an Nitrit, das bei Vergiftungen durch nitratreiches Futter nach dieser Zeit festgestellt worden war.

Während der Vormagenverdauung von zwei bis sechs Stunden wird die Zellstruktur des aufgenommenen Pflanzenmaterials zerstört und die in den Zellen enthaltenen, wasserlöslichen Stoffe gelangen in den Pansensaft. Durch die Pansensaftuntersuchung ist also die Konzentration von bereits freigesetztem Nitrat festzustellen, wie auch daraus entstandenes Nitrit oder NA, ohne allerdings die laufende Resorption aus dem Panseninhalt berücksichtigen zu können. Das Vorhandensein von Nitrit zeigt an, daß bei der Probennahme der Abbau von Nitrat noch im Gange war.

In den Pansensaftproben 4 und 5 wurden Spuren von DANA festgestellt. Da diese Werte unter der sicheren Nachweisgrenze des angewendeten Verfahrens liegen, bleibt das Ergebnis zweifelhaft. (Bei der für diesen Versuch gewählten Einwaagemenge lag die Nachweisgrenze bei 3 ppb NA in der Ausgangssubstanz.)

Im Rahmen dieser Fragestellung wurde auch der Panseninhalt von vier Mastbullen nach der Schlachtung untersucht. Die Tiere hatten u.a. Maissilage erhalten. Nitrit- und Nitratwerte wurden orientierend nur bei einem Tier festgestellt, während die NA-Analytik bei allen vier Proben vorgenommen wurde. Nitrit- und Nitratgehalt lagen bei 0 ppm bzw. 3,1 ppm. NA waren in keiner der Proben vorhanden.

3.3.1.3 Milch

Es wurden insgesamt 17 Proben aus Einzelgemelken untersucht. Gefüttert wurden die betreffenden Tiere u.a. mit Rübenblatt-Maissilage (Werte der Silage siehe Tabelle I). Die Ergebnisse der Nitrit-Nitratuntersuchung sind in Tabelle III zusammengefaßt.

Tabelle III: Nitrit- und Nitratwerte aus Einzelgemelken

Gemelk Nr.	Nitrit (ppm)	Nitrat (ppm)
1 (x)	0,0	1,2
2	0,1	0,2
3 (x)	0,2	1,8
4 (x)	0,2	2,6
5	0,1	0,6
6	0,3	1,6
7	0,4	0,7
8 (x)	0,1	1,8
9 (x)	0,3	5,6
10	0,2	0,7
11	0,1	0,7
12 (x)	0,2	1,6
13 (x)	0,0	2,1
14 (x)	0,0	2,9
15	0,2	0,7
16	0,2	0,6
17	0,4	0,8

Mit den bezeichneten (x) Proben wurden weitere Untersuchungen vorgenommen (siehe Tabelle IV).

Die bei gleicher Fütterung stark divergierenden Werte sind ein Hinweis darauf, daß die aus dem Blut in die Milch übergehende Nitratmenge individuellen Schwankungen unterliegt. Sämtliche hier aufgeführten Milchproben stammen aus einem Abkalbestall. Untersucht wurde zwar nur Milch von Kühen, die mehr als drei Tage vorher abgekalbt hatten, es ist aber nicht auszuschließen, daß die mit dem Beginn der Laktation einhergehenden Veränderungen an der Milchdrüse eine Auswirkung auf die Nitratkonzentration der

Milch haben. Außerdem ist zu berücksichtigen, daß bei den den Tabellen III und IV zugrundeliegenden Untersuchungen noch nicht, wie für die übrigen in dieser Arbeit angegebenen Werte, mindestens vier, sondern nur zwei Parallelproben angesetzt wurden.

Die - verglichen mit anderen frisch ermolkenen Milchproben - relativ hohen Nitritwerte (siehe Tabelle VII) dürften damit zu erklären sein, daß die Milch aus technischen Gründen nicht gleich nach dem Melken gekühlt werden konnte, sondern zwei bis drei Stunden bei Stalltemperatur aufbewahrt werden mußte. Die in Tabelle IV bezeichneten Proben wurden weiter beobachtet.

Tabelle IV: Untersuchungen über den Verlauf des Nitritgehaltes der Milch in Abhängigkeit von Lagerung und Temperatur (Mengenangaben in ppm)

Milch- probe	frische Milch			3 Tage alt		5 Tage alt	
	roh		gekocht	roh	gekocht	roh	gekocht
	Nitrit	Nitrat	Nitrit	Nitrit	Nitrit	Nitrit	Nitrit
1	0,0	1,2		0,3			
3	0,2	1,8		0,1	0,1	0,1	
4	0,2	2,6		0,8			
8	0,1	1,8	0,1	0,0		0,1	
9	0,3	5,6	0,3	0,3	0,3	0,6	
12	0,2	1,6		0,1		0,0	0,1
13	0,0	2,1		0,0		0,4	
14	0,0	2,9		0,7			

Weder nach Aufbewahrung im Kühlschrank bei 6°C (drei und fünf Tage) noch durch Kochen waren in diesem Versuch signifikante Änderungen der Nitritwerte festzustellen. Nur eine von den acht

untersuchten Proben zeigte, als höchste Nitritzunahme überhaupt, einen Anstieg von 0 auf 0,7 ppm am dritten Tag, eine weitere - ebenfalls am dritten Tag - von 0,2 ppm auf 0,8 ppm. Bei den übrigen Proben traten Änderungen des Nitritwertes zwischen 0,1 und 0,3 ppm auf.

Von den in Tabelle IV aufgeführten Proben wurden drei nach unterschiedlichen Lagerzeiten bei 6°C z.T. roh, z.T. erhitzt, auf NA untersucht (siehe Tabelle V). Alle Proben waren NA-negativ.

Tabelle V: Lagerungszeit und Zustand der Probe (roh und gekocht) bei Vornahme der NA-Untersuchung

Probe	Lagerungszeit in Tagen				
	1	2	3	4	5
9	roh		roh		gekocht
14	roh			roh und gekocht	
1	gekocht				

3.3.2 Untersuchungen zum Verbleib von NA im Panseninhalt von lebenden Tieren und in vitro

3.3.2.1 Verabreichung von NA an Milchkühe

Laktierenden Kühen wurde über fünf Tage täglich zweimal 5 mg DÄNA verabreicht. Vor Beginn des eigentlichen Versuchs war festgestellt worden, daß unter den gegebenen Haltungsbedingungen keine NA in dem untersuchten Pansensaft vorhanden waren. Während der Versuchsdauer wurden täglich Milchproben aus dem Abendgemelk entnommen und untersucht. Alle Milchproben waren NA-negativ. Zum

Abschluß des Versuchs wurden am 5. Tag eine Stunde und drei Stunden nach der DÄNA-Verabreichung Pansensaftproben entnommen. Auch diese enthielten keine NA..

Bei diesem Versuch betrug die Nachweisgrenze bei der NA-Untersuchung am - inzwischen verbesserten - Massenspektrometer 0,5 mcg/ml Extrakt. Setzt man einen Panseninhalt von 50 - 70 kg voraus, so müßten 5 mg DÄNA nach der Durchmischung mit dem Panseninhalt in Konzentrationen von 100 ppb bzw. 70 ppb im Pansensaft nachzuweisen sein.

Für das Verschwinden der NA aus dem Pansensaft gibt es mehrere Erklärungen:

1. Sie wurden durch Pansenmikroorganismen abgebaut.
2. Sie wurden resorbiert, oder als wasserdampf-flüchtige Stoffe
3. durch den Ruktus nach außen abgegeben.

Vorausgesetzt, die verabreichte DÄNA-Menge wurde resorbiert, so hätten zwischen 0,15% und 0,85% in die Milch übergehen müssen. (Diese Werte wurden nach Verabreichung von subletalen NA-Dosen an Ziegen festgestellt.)

Bei einer Milchleistung von acht Litern pro Melkzeit würden, wenn 0,15% - 0,85% des verabreichten DÄNA in die Milch übergegangen wären, zwischen 1 ppb und 1,75 ppb DÄNA in der Milch zu erwarten sein. Diese Werte liegen bereits unterhalb der für diese Versuche sich ergebenden Nachweisgrenze von 3 - 5 ppb. Es läßt sich also aussagen, daß NA, falls sie in die Milch übergegangen sind, Konzentrationen über 3 - 5 ppb nicht erreichten.

3.3.2.2 In vitro-Versuch zum mikrobiellen Abbau von NA im Pansensaft

Um herauszufinden, ob und wie schnell NA von Pansenmikroorganismen abgebaut werden können, wurde ein in vitro-Versuch mit

Pansensaft vom Schaf durchgeführt, dem DÄNA zugesetzt war. Nach Bebrütungszeiten von zwei, vier und sechs Stunden wurde die zugesetzte DÄNA-Menge kontrolliert. In keiner der Proben war die NA-Konzentration gesunken, d.h. daß DÄNA innerhalb von sechs Stunden von Pansenlebewesen nicht abgebaut wird.

3.3.3 Modellversuche zur Bildung von NA in Milch

3.3.3.1 Untersuchungen an roher und erhitzter Sammelmilch mit und ohne Nitratzusatz

Sammelmilch aus der Molkerei wurde auf Nitrit- und Nitratgehalt untersucht, dann in steigenden Mengen mit Nitrat versetzt und 15 Stunden (z.T. auch 40 Stunden) bei 10°C aufbewahrt und danach, teils nach Erhitzung, erneut der Nitritgehalt festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle VI zusammengefaßt.

Die Milchproben wurden in den Monaten Mai und Juni untersucht, und zwar zunächst bei kühlem Wetter. In diesen ersten Proben war ursprünglich kein Nitrit vorhanden. Nach einem Wetterumschwung zu hochsommerlichen Temperaturen enthielten die weiteren Proben von Anfang an Nitrit (0,2 - 0,5 ppm). Bei allen Untersuchungen zeigte sich, daß die gebildete Nitritmenge bei höheren Nitratkonzentrationen anstieg. Milchproben, in denen von Beginn an Nitrit vorhanden war, verhielten sich dabei abweichend von den am ersten Tag nitritfreien, es wurde nämlich weniger Nitrit gebildet und der Anstieg von M 1 zu M 3 verlief nicht so regelmäßig.

Am dritten Tag scheint der Nitritgehalt wieder abzunehmen, soweit dies anhand der wenigen Untersuchungen ersichtlich ist. Bei einigen im Autoklaven erhitzten Proben zeigte sich ein Nitritanstieg.

Insgesamt vier Proben (je zwei mit ursprünglichem Nitratgehalt = M 1 und zwei mit maximalem Nitratgehalt = M 3) wurden nach einer Erhitzung von 120°C für 15 Minuten im Autoklaven auf die Anwesenheit von NA untersucht. Alle Ergebnisse waren NA-negativ.

Tabelle VI: Nitritgehalt in Milch mit unterschiedlich hohem Nitratzusatz nach 15 (und 40) Stunden Lagerung bei 10°C, teils nach Erhitzung (auf 120°C).
(Angaben von Nitrit- und Nitratwerten in ppm)

Milch	Lagerungszeit					
	0		15 Stunden		40 Stunden	
	Nitrit roh	Nitrat roh	Nitrit roh	Nitrit erhitzt	Nitrit roh	Nitrit erhitzt
M 1	0,0	1,4	0,3		0,0	
M 1	0,0	0,8	0,3			
2		1,8	0,5			
3		5,1	0,8			
M 1	0,0	1,7	0,2			
2		2,1	0,6			
3		3,8	n.d.			
M 1	0,0	1,2	0,8		0,3	
2		1,6	0,9		0,2	
3		3,2	1,0		0,3	
M 1	0,2	1,1	0,0			
2		3,1	0,1			
3		5,6	0,9			
M 1	0,5	0,5	0,0	0,2	n.d.	0,0
2		3,2	n.d.			
3		5,0	0,0	0,2	n.d.	0,1
M 1	0,2	2,3	0,1		0,1	0,2
2		4,6	0,2			
3		5,9	0,3		0,2	0,3

Zeichenerklärung: M 1 = Milch ohne Zusatz
M 2 = Milch mit geringem Nitratzusatz
M 3 = Milch mit höherem Nitratzusatz

3.3.3.2 Untersuchungen an frischer Milch aus Einzelgemelken mit Nitritzusatz, gekocht und autoklaviert

In einer zweiten Versuchsreihe wurde frisch ermolzene Milch mit Nitrit versetzt und jeweils eine Hälfte der nitritangereicherten Milch gekocht, die andere Hälfte für eine Minute im Autoklaven auf 120°C erhitzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle VII zusammengefaßt.

Tabelle VII: Frisch ermolzene Milch aus Einzelgemelken mit Nitritzusatz erhitzt (Nitrit- und Nitratwerte in ppm angegeben)

Milch Nr.	Rohe Milch			Erhitzte Milch			
	Nitrit urspr.	Nitrat urspr.	Nitrit n. Zusatz	nach Kochen Nitrit	120°C NA	Nitrit	NA
1	0,0	0,9	0,5	0,5	0	0,6	0
2	0,0	1,4	0,3	0,4	0	0,8	0
3	0,1	1,0	0,3	0,3	0	0,4	0
4	0,0	0,9	0,2	0,3	0	0,4	0

Während das Kochen den Nitritgehalt der Milch im allgemeinen nur geringfügig erhöhte (nie mehr als 0,1 ppm), wurde er nach dem kurzzeitigen Erhitzen auf 120°C um 0,1 bis 0,5ppm erhöht. Jede der gekochten und autoklavierten Proben (insgesamt acht) wurde auch auf das Vorliegen von NA untersucht. NA hatten sich in keiner der Proben gebildet.

4 DISKUSSION

Ausgehend von Literaturangaben über das Vorkommen von NA in Silage (MÖHLER und HALLERMAYER, 1974; TERPLAN et al., 1978) und Milch (HEDLER und MARQUARDT, 1968) - inzwischen sind allerdings erhebliche Zweifel angebracht, ob die bei der Milchuntersuchung angewandte Methodik gegenwärtig noch als stichhaltig gelten kann - wurde in dieser Arbeit untersucht, ob und in welchem Glied der Kette Futter - Vormagenverdauung - Milch NA entstehen können bzw. ob im Futter oder im Pansen vorhandene NA in die Milch übergehen können.

Da nach DRESSEL (1976), SANDER und SCHWEINSBERG (1972) und SANDER et al. (1974) NA in frischem Grünfutter nicht zu erwarten sind, wurde dazu nur eine Untersuchung an Rübenblatt durchgeführt, die ein negatives Ergebnis erbrachte. Um festzustellen, ob NA in Silagen, die aus bekanntermaßen überdurchschnittlich nitrathaltigen Pflanzen hergestellt wurden, regelmäßig oder nur zu bestimmten Zeiten der Lagerung vorkommen, wurden insgesamt 14 Silageproben untersucht. Zwei dieser Silagen wurden über die gesamte Zeit ihrer Verfütterung kontrolliert. Keine der Untersuchungen erbrachte einen Hinweis auf das Vorhandensein von NA. Selbst in einer verdorbenen Silage gegen Ende der Silagefütterung verlief der Nachweis negativ. Unter Berücksichtigung der äußerst komplexen, mikrobiellen Vorgänge bei der Gärung der Silagen sowie anderer Faktoren, wie klimatische Einflüsse während der Wachstumszeit der Pflanzen oder Gegebenheiten des Bodens mit daraus resultierenden unterschiedlichen Gehalten an Stoffen, die katalysierend oder hemmend auf die Synthese von NA wirken, läßt sich sagen, daß NA in Silagen vorkommen können - wie das auch aus Versuchen von MÖHLER und HALLERMAYER (1974) und TERPLAN et al. (1978) hervorgeht - aber nicht vorhanden zu sein brauchen.

Neben der Erwägung der möglichen Aufnahme von NA mit dem Futter, z.B. mit NA-haltiger Silage oder nitritkonserviertem Fischmehl, wurde von der Überlegung ausgegangen, daß in den Wiederkäuermägen gute Voraussetzungen für eine NA-Synthese gegeben sind. Die NA-Bildung war unter bestimmten Voraussetzungen (Subazidität und bakterielle Besiedelung) schon für den einhöhligen Magen beschrieben worden (FINE et al., 1977; SANDER, 1973; SANDER und BÜRKLE, 1969; SANDER und SCHWEINSBERG, 1968; SANDER und SEIF, 1969; SEN et al., 1969).

Um eine eventuelle NA-Synthese im Wiederkäuermagen zu ermitteln, wurden Versuche an einer Pansenfistelkuh vorgenommen, der frisches Rübenblatt und Heu verfüttert wurde. Die im Rahmen des sechs Tage dauernden Versuchs entnommenen Pansensaftproben enthielten nicht eindeutig NA. Lediglich am vierten und fünften Tag ergaben sich Anhaltspunkte für Spuren an DÄNA. Diese Ergebnisse deuten die Möglichkeit an, daß NA im Pansen gebildet werden können, ohne jedoch zu kumulieren.

Da sich aus Versuchen mit Bakterienkulturen (ROWLAND und GRASSO, 1975) die Möglichkeit andeutete, daß auch im Pansen mit einer mikrobiellen Destruktion der NA zu rechnen ist, wurden entsprechende Untersuchungen am Pansensaft durchgeführt, der einem Schaf mit Pansenfistel entnommen worden war. Innerhalb einer Inkubationszeit von sechs Stunden, unter Wahrung physiologischer Bedingungen, konnte kein Abbau beobachtet werden. Dieses Ergebnis steht nur in scheinbarem Widerspruch zu den Untersuchungen von ROWLAND und GRASSO (1975), deren Ergebnisse über bakterielle Degradation von NA auf eine Versuchsdauer von 20 Stunden bezogen sind. Außerdem variieren "die Fähigkeit zum NA-Abbau beträchtlich, sowohl zwischen den Bakterienarten als auch die verschiedenen NA betreffend". Für die Verdauung im Pansen wird aber nur eine Zeit von zwei bis sechs Stunden angegeben (SCHEUNERT und TRAUTMANN, 1965). Wenn daher NA entstanden waren

und innerhalb der für die Vormagenverdauung zur Verfügung stehenden Zeit nicht abgebaut wurden, könnte ein Grund für den nur zweifelhaften Nachweis die schnelle Resorption aus dem Pansen sein, wie sie von JUSZKIEWICZ und KOWALSKI (1973) beschrieben wird. Die Autoren hatten nahezu letale Dosen verschiedener NA (darunter auch DÄNA) mittels Magenschlundsonde direkt in den Pansen laktierender Ziegen verabreicht. Die NA waren schon nach 1 - 2 Stunden mit maximaler Konzentration im Blut der Tiere nachzuweisen. Bereits 30 Minuten nach der Verabreichung waren Spuren von NA in der Milch der Tiere festzustellen, um dort nach weiteren 90 Minuten die Höchstkonzentration von 0,15 - 0,85% der verabreichten Menge zu erreichen. Die Blutkonzentration der resorbierten NA lag im allgemeinen etwas höher als die in Milch. Über den Verbleib der nicht durch die Blutuntersuchung erfaßten NA wird von den Autoren nicht berichtet. Die Versuche von JUSZKIEWICZ und KOWALSKI (1973) können dazu verleiten, den mit der Materie weniger Vertrauten folgern zu lassen, daß bei Vorhandensein von NA in Silage auch mit deren Vorkommen in Milch zu rechnen ist, was speziell für die Säuglings- und Kinderernährung Konsequenzen haben könnte. Tatsächlich haben auch andere Autoren aufgrund dieser Untersuchungen auf die Möglichkeit des Vorkommens von NA in Milch hingewiesen (MÖHLER und HALLERMAYER, 1974).

Um die Frage des Übertritts von NA in die Milch unter einigermaßen natürlichen Verhältnissen zu prüfen, wurde an zwei Milchkühe DÄNA in einer Menge verabreicht, die dem dreifachen der bisher in Silage ermittelten Höchstkonzentration an NA (TERPLAN et al., 1978) entspricht, bei einer vorausgesetzten Silagemenge von 50 kg/Mahlzeit. Selbst bei diesen, deutlich über den realen Möglichkeiten liegenden Bedingungen, war unter Berücksichtigung der Versuche von JUSZKIEWICZ und KOWALSKI (1973) nur eine knapp über der Nachweisgrenze liegende NA-Konzentration in der Milch zu erwarten. Tatsächlich konnte DÄNA in der Milch nicht nachgewiesen werden.

Um den Verbleib der NA im Panseninhalt zu überprüfen, waren ein und drei Stunden nach der Verabreichung Pansensaftproben entnommen und untersucht worden. Schon nach einer Stunde war DÄNA im Pansensaft nicht mehr nachweisbar. Neben der Resorption ist für das Verschwinden der NA auch die Entfernung der wasserdampfflüchtigen Stoffe aus dem Panseninhalt durch den Ruktus in Betracht zu ziehen.

Möglicherweise waren diese Versuche mit denen von JUSZKIEWICZ und KOWALSKI (1973) nicht zu vergleichen, da bei den Experimenten der Genannten durch die hohen Dosen eventuell andere pharmako-kinetische Voraussetzungen vorlagen und somit die Ausscheidungsrate nicht auf geringere, im Pansen enthaltene, Mengen übertragen werden konnte. Selbst wenn die gesamte Menge des verabreichten DÄNA resorbiert wurde, wäre nach Untersuchungen von GOMEZ et al. (1977) mit einem Auftreten der NA in der Milch nicht zu rechnen. Nach diesen, an Ratten mit DMNA durchgeführten Experimenten verhindert die Leber bei Dosen unter 40 mcg/kg Körpergewicht eine Verbreitung der NA im Körper. (Die geringste von JUSZKIEWICZ und KOWALSKI verabreichte Dosis war 1 mg/kg Körpergewicht.)

Immerhin läßt der eigene Versuch die Aussage zu, daß NA in den Mengen, wie sie unter praktischen Gegebenheiten in Futter auftreten können, nicht bzw. nicht in nachweisbaren Konzentrationen in die Milch übertreten. Bedenklich könnten höchstens Situationen sein, wie sie aus Norwegen von ENDER und CEH (1968) berichtet werden: Wiederkäuer waren mit Heringsmehl gefüttert worden, das mit ungewöhnlich hohen Nitritdosen konserviert war. Nach dem Auftreten von Vergiftungsfällen unter den damit gefütterten Tieren wurden als deren Ursache NA-Konzentrationen von 50 - 100 ppm im Heringsmehl festgestellt.

Als eine mögliche Ursache für das Vorkommen von NA in Milch wurde die Synthese in der Milch selbst in Betracht gezogen. Voraussetzung dafür wäre das Vorhandensein von Nitrat bzw. durch

mikrobielle Reduktion oder Zerfall bei hochgradiger Erhitzung aus diesem entstehendes Nitrit. Amine sind natürlicherweise in Abhängigkeit vom Futter in Milch vorhanden und können dort durch mikrobielle Aktivität gebildet werden.

Die eigenen Untersuchungen zeigten, daß eigentlich immer mit Nitrat in der Milch zu rechnen ist. Der Durchschnittswert in Einzelgemelken lag bei 1,6 ppm, der höchste Wert wurde in einem Gemelk mit 5,6 ppm ermittelt. Der letztgenannte Wert liegt deutlich über den - in der Literatur für Einzelmilch angegebenen - 2 ppm (SIEBER und BLANC, 1978). Der in mehreren Paralleluntersuchungen bestätigte Wert könnte eventuell darauf zurückgeführt werden, daß er von einem Tier stammte, dessen Kalbung nur wenige Tage zurücklag. Möglicherweise traten dadurch Unterschiede in der Durchlässigkeit der Blut-Euterschranke auf, was in weiteren Untersuchungen zu prüfen wäre.

Während unmittelbar nach dem Ermelken untersuchte Milch kein Nitrit enthielt, wurden in Einzelgemelken, die mehrere Stunden alt waren, Nitritwerte von durchschnittlich 0,2 ppm festgestellt. Der höchste ermittelte Nitritwert lag bei 0,4 ppm. Diese Werte änderten sich i.a. nach Aufbewahrungszeiten von drei bis fünf Tagen nicht wesentlich. In der untersuchten Sammelmilch lagen die Werte für Nitrat im allgemeinen bei 1 ppm. Bei kühlem Wetter konnte zunächst kein Nitrit in der Milch festgestellt werden, während nach einem Wetterumschwung zu hochsommerlichen Temperaturen Nitrit regelmäßig nachgewiesen werden konnte. Der höchste Nitritwert in Sammelmilch lag bei 0,5 ppm. In Sammelmilch, die mit Nitrat bis maximal 5,9 ppm angereichert worden war, wurden durch mikrobielle Reduktion Nitritwerte bis 1,0 ppm erreicht. Im Gegensatz zu Milch aus Einzelgemelken besteht bezüglich der Menge des gebildeten Nitrits stets ein Zusammenhang mit der Menge des vorhandenen Nitrats, was mit dem regelmäßigen Vorkommen nitratreduzierender Keime in der Sammelmilch zu erklären

ist. Eine Erhöhung des Nitritwertes konnte, außer aufgrund mikrobieller Reduktion, auch nach kurzzeitigem Erhitzen auf 120°C und in geringerem Maße auch nach Kochen festgestellt werden.

Wenn auch mit der Entstehung von Nitrit eine wesentliche Voraussetzung für die NA-Synthese nachgewiesen werden konnte, so waren doch in insgesamt vier Proben roher und fünfzehn Proben teils gekochter, teils auf 120°C erhitzter Milch mit und ohne Nitrit- und Nitratzusätze keine NA nachzuweisen.

Dies steht in einem gewissen Gegensatz zu der Publikation von TERPLAN et al. (1978), wonach in je einer Probe Rohmilch und H-Milch NA gefunden wurden. Während es sich bei der Rohmilch um eine stark verdorbene Probe handelte, haben sich einerseits hinsichtlich einer Synthese in der erhitzten Milch Zweifel ergeben, ob nicht methodische Gründe dafür in Betracht kommen. Andererseits sind die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Modellversuche an autoklavierter Milch nicht repräsentativ für die Erhitzung von H-Milch, da diese, zumindest bei den am häufigsten angewandten Verfahren, im geschlossenen System den hohen Temperaturen ausgesetzt ist, wobei NA nicht entweichen können, während bei der Erhitzung im Autoklaven und den relativ losen Verschlüssen der Gefäße eventuell gebildete NA flüchtig geworden sein können. Für die direkte Erhitzung hingegen wäre dieses Modell anwendbar, da bei diesem Verfahren NA spätestens bei der Entspannung der Milch entweichen würden.

In roher Milch könnten NA nach den Untersuchungen von TERPLAN et al. (1978) und diesen ergänzenden Untersuchungen nur erwartet werden, wenn es zu einer erheblichen Verderbnis kommt, so daß in Rohmilch weder mit NA aus dem Verdauungstrakt der Milchtiere noch mit ihrer Entstehung in der Milch selbst zu rechnen ist, sofern sie einigermaßen hygienisch gewonnen und behandelt wurde.

5 ZUSAMMENFASSUNG

1. Pflanzliche Futtermittel, insbesondere Silage, sowie Panseninhalt und Milch von Rindern wurden auf Nitrosamine (NA), daneben auch auf Nitrit und Nitrat untersucht.
2. Insgesamt 13 Silage-Proben aus zwei Silos, ferner eine Probe verdorbener Silage, wurden während der Lagerungszeit in die NA-Untersuchung einbezogen. Alle Ergebnisse waren negativ.
3. Vier Proben aus dem Panseninhalt vier geschlachteter Mastbullen waren NA-negativ, während unter sechs Pansensaftproben - einer mit frischem Rübenblatt (nitratreich) und Heu gefütterten Kuh - bei zweien der Verdacht auf die Anwesenheit (Spuren) von Diäthylnitrosamin (DÄNA) bestand.
4. Um den Verbleib von NA im Wiederkäuermagen zu untersuchen, wurde in einem in vitro-Versuch Pansensaft mit DÄNA versetzt und bebrütet. Auch nach sechs Stunden war kein Abbau des NA festzustellen. Mit dem gleichen Ziel wurde DÄNA an laktierende Rinder verabreicht. Schon eine Stunde nach Verabreichung war das NA nicht mehr nachweisbar. In der Milch der Versuchstiere war allerdings ebenfalls kein NA nachweisbar.
5. Der Nitritgehalt roher Sammelmilch nahm bei der Lagerung in Abhängigkeit vom Nitratgehalt zu. Auch Kochen und mehr noch Erhitzen auf 120°C erhöhte den Nitritgehalt von Milch.
6. Die Ergebnisse der NA-Untersuchung von insgesamt 19 Proben roher, gekochter oder auf 120°C erhitzter Milch, z.T. nach bakterieller Nitritbildung oder Nitritzusatz, waren ausnahmslos negativ.

SUMMARY

1. Vegetable feeding stuff, especially silage as well as rumen-contents and milk of cattle were examined for nitrosamines, nitrite and nitrate.
2. In all 13 silage samples originating from two silos and furthermore one sample of rotten silage were examined for nitrosamines (NA) during the time of their storage. All results were negative.
3. Four samples taken of the rumen-contents of four fattened butchered bulls were NA-negative whereas there was a suspicion of traces of Nitrosodiethylamine (NDEA) in two samples of rumen liquor - out of six - of a cow, fed with fresh turnip leaves (rich in nitrate) and with hay.
4. To find out what happens to NA in the stomach of ruminants NDEA was added to rumen liquor and incubated during an in vitro-test. There was no destruction of NA, not even after the passing of six hours. Another test was made for the same purpose: NDEA was administered orally to lactating cattle. Only one hour later the NA were no more detectable. In the milk of the tested animals, however, no NA were detectable either.
5. The concentration of nitrite in raw dairy milk increased during storage depending on its nitrate-content. The heating of milk increased the nitrite-content as well. But the heating of milk up to 120°C increased the nitrite-content more than boiling.
6. The results of NA-examinations of 19 samples of milk in all (raw, boiled or heated up to 120°C) partly after bacterial formation of nitrite or after adding of nitrite were all negative without any exception.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ALLISTON, T.G., G.B. COX und R.S. KIRK (1972):

The Determination of Steam-Volatile N-Nitrosamines in Foodstuffs by Formation of Electron-Capturing Derivatives from Electrochemically Derived Amines.

Analyst 97, 915.

AYANABA, A. und M. ALEXANDER (1973):

Microbial Formation of Nitrosamines in Vitro.

Appl. Microbiol. 25, 862.

BERGNER, H. (1970):

Tierernährung.

Akademie-Verlag Berlin, Reihe Biologie und Landwirtschaftswissenschaft 45, 86.

BOGOVSKI, P., M. CASTEGNARO, B. PIGNATELLI und E.A. WALKER (1972):

The Inhibiting Effect of Tannins on the Formation of Nitrosamines.

IARC Sci. Publ. 3, 127.

BUCHNER, A., J. DRESSEL und J. JUNG (1973):

Einfluß der Stickstoffform auf die Verarbeitungsqualität des Weizens unter besonderer Berücksichtigung des Gehaltes an Nitrosaminen.

Getreide, Mehl, Brot 27, 221.

CERUTTI, G., R. ZAPPAVIGNA und P.L. SANTINI (1975):

N-Alkyl-Nitrosamines in Italian and Imported Cheese.

Latte 224.

CROSBY, N.T., J.K. FOREMAN, J.F. PALFRAMAN und R. SAWYER (1972):

Estimation of Steam-Volatile N-Nitrosamines in Foods at the mcg/kg Level.

Nature 238, 342.

DAVISON, K.L., W.M. HANSEL, L. KROOK, K. McENTEE und
M.J. WRIGHT (1964):

Nitrate Toxicity in Dairy Heifers. I. Effects on Repro-
duction, Growth, Lactation, and Vitamin A Nutrition.
J. Dairy Sci. 47, 1065.

DOBBERTIN, S. (1975):

Nitrosamine und deren Präkursoren.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82, 324.

DRESSEL, J. (1973):

Über das Vorkommen von Nitrosaminen in pflanzlichem Material.
Landwirtsch. Forsch. Sonderheft 28, 273.

DERSELBE (1976):

Untersuchungen über unerwünschte N-Verbindungen in Nahrungs-
und Futterpflanzen.

Sonderdruck: Aus der landwirtschaftlichen Versuchsstation
Limburghof/Pfalz, der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik AG,
Ludwigshafen/Rhein.

EISENBRAND, G. und P. MARQUARDT (1969):

Über die Problematik des Vorkommens von N-Nitrosoverbindungen
in der Nahrung.
Med. Ern. 10, 73.

EISENBRAND, G., E. von RAPPARD, R. ZAPPE und R. PREUSSMANN (1975)

Trace Analysis of Volatile Nitrosamines by a Modified Nitrogen-
Specific Detector in Pyrolytic Mode and by Ion-Specific Deter-
mination of Heptafluoro-Butyramides in a Gas Chromatography
Mass Spectrometry System.

Proc. of 4th Meeting on Analysis and Formation of N-Nitroso-
Compounds, Tallin/USSR, October 1 - 2.

ENDER, F. und L. CEH (1968):

Occurrence of Nitrosamines in Foodstuffs for Human and Animal
Consumption.

Food Cosmet. Toxicol. 6, 569.

FAN, T.Y. und S.R. TANNENBAUM (1973 a):

Factors Influencing the Rate of Formation of Nitroso-morpholine from Morpholine and Nitrite.

J. Agr. Food Chem. 21, 967.

DIESELBEN (1973 b):

Natural Inhibitors of Nitrosation Reactions: The Concept of Available Nitrite.

J. Food Sci. 38, 1067.

FARRA, P.A. und L.D. SATTER (1971):

Manipulation of the Ruminal Fermentation. III. Effect of Nitrate on Ruminal Volatile Fatty Acid Production and Milk Composition.

J. Dairy Sci. 54, 1018.

FINE, D.H. und D.P. ROUNBEHLER (1975):

Rapid Method for the Determination of Amounts of N-Nitroso-Compounds in Foodstuffs.

Anal. Chem. Acta 78, 383.

FINE, D.H., R. ROSS, D.P. ROUNBEHLER, A. SILVERGLEID und S. SONG (1977):

Formation in Vivo of Volatile N-Nitrosamines in Man After Ingestion of Cooked Bacon and Spinach.

Nature 265, 753.

FOLLET, M.J. und P.W. RATCLIFF (1963):

Determination of Nitrite and Nitrate in Meat Products.

J. Sci. Food Agric. 14, 138.

FONG, Y.Y. und W.C. CHANG (1973):

Bacterial Production of Di-Methyl Nitrosamine in Salted Fish.

Nature 243, 421.

FREIMUTH, U. und E. GLÄSER (1970):

Zum Auftreten von Nitrosaminen in Lebensmitteln.
Nahrung 14, 357.

GOMEZ, M.I.D., P.F. SWANN und P.N. MAGEE (1977):

The Absorption and Metabolism in Rats of Small Oral Doses
of Dimethylnitrosamine.
Biochem. J. 164, 497.

GREENBLATT, M. und S.S. MIRVISH (1973):

Dose-Response Studies with Concurrent Administration of
Piperazine and Sodium Nitrite to Strain A Mice.
J. Nat. Cancer Inst. 50, 119.

GROSS, F. und K. RIEBE (1974):

Gärfutter, Betriebswirtschaft, Erzeugung, Verfütterung.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

HÄNNI, H. (1954):

Über den Nitratsnachweis in Milch.
Mitt. Geb. Lebensm. Unters. Hyg. 45, 502.

HAVERY, D.C., D.A. KLINE, E.M. MILETTA, F.L. JOE Jr. und
T. FAZIO (1976):

Survey of Food Products for Volatile N-Nitrosamines.
J. Ass. Off. Anal. Chem. 59, 540.

HEDLER, L. und P. MARQUARDT (1968):

Occurrence of Diethylnitrosamine in Some Samples of Food.
Food Cosmet. Toxicol. 6, 341.

JUSZKIEWICZ, T. und B. KOWALSKI (1973):

Passage of Nitrosamines from Rumen into Milk of Goats.
IARC Sci. Publ. 9, 173.

KARLSON, P. und A. BUTENANDT (1964):

Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 132.

JUSZKIEWICZ, T. und B. KOWALSKI (1973):

Zum Einfluß des Nitratgehaltes im Futter auf die Werte in Kuhmilch.
XIX. Int. Dairy Congr. 1 D, 88.

KLUBES, P., I. CERNE, A.D. RABINOWITZ und W.R. JONDORF (1972):

Factors Affecting Dimethylnitrosamine Formation from Simple
Precursors by Rat Intestinal Bacteria.
Food Cosmet. Toxicol. 10, 757.

KUNISAKI, N., H. MATSUURA und M. HAYASHI (1976):

Formation of N-Nitrosodimethylamine by E. Coli.
J. Food Hyg. Soc. Japan 17, 314.

LEONHARD-KLUZ, J., A. WIERNY, F. BIELAK und E. PASIEKA (1974):
Investigations on Some Constituents and Properties of the Milk
of Cows Fed on Hay From Grassland Fertilized with High Levels
of Mineral Nitrogen.

Roczniki Naukowe Zootechniki 1 (1), 111.
ref.: Dairy Sci. Abstr. 38 (1976), 569.

LEWIS, D. (1951):

The Metabolism of Nitrate and Nitrite in the Sheep. (1. The
Reduction of Nitrate in the Rumen of the Sheep).
Biochem. 48, 175.

MAHIEU, H., F.M. LUQUET und L. MOUILLET (1976):

A Propos de la Teneur des Laits Individuels et de Mélange
en Matières Minérales et Urée.
Lait 56, 657.

MARQUARDT, P. (1971):

Vorkommen und Bildung von N-Nitroso-Verbindungen in der
menschlichen Umwelt.
Arzneim. Forsch. 21, 1752.

MAYER, K. (1976):

Biogene Amine in Lebensmitteln. Eigene Untersuchungen in Wein
und Sauerkraut.
Qual. Plant. Pl. Fds. hum. Nutr. 26, 263.

METHA, R.S., R. BASSETTE und G. WARD (1974):

Trimethylmine Responsible for Fishy Flavor in Milk from
Cows on Wheat Pasture.

J. Dairy Sci. 57, 285.

MIRVISH, S.S. (1970):

J. Nat. Cancer Inst. 44, 633.

zit. nach SCHWEINSBERG, F. (1974): Rhodanid als Katalysator
der Nitrosaminsynthese in vivo.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 227, 121.

MÖHLER, K., O.L. MAYRHOFER und E. HALLERMAYER (1972):

Das Nitrosaminproblem aus der Sicht des Lebensmittelchemikers.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 150, 1.

MÖHLER, K. und E. HALLERMAYER (1973):

Bildung von Nitrosaminen aus Lecithin und Nitrit.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 151, 52.

DIESELBEN (1974):

Possible Mechanisms of Nitrosamine Formation in Food and
Aminal Feeding Stuffs.

IARC Sci. Publ. 9, 142.

MOHR, U., J. ALTHOFF, A. EMMINGER und H. BRESCH (1972):

Effect of Nitrosamines on Nursing Syrian Golden Hamsters and
Their Offspring.

Z. Krebsforsch. 78, 73.

NAKAMURA, Y., J. YOSHIDA, R. NAKAMURA und H. HORIE (1976):

Nitrate Metabolism of Microorganisms in the Rumen of Sheep
Fed High Nitrate Forages.

Jap. J. Zootechn. Sci. 47, 63.

PREUSSMANN, R. (1973):

Toxicity of Nitrite and N-Nitroso Compounds.

Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prod. 217.

REINECCIUS, G.A. und S.T. COULTER (1972):

Examination of Nonfat Dry Milk for the Presence of Nitrosamines.
J. Dairy Sci. 55, 1574.

REMOND, B. (1975):

La Teneur du Lait de Vache en Nitrate.
Lait 55, 390.

RESMINI, P. und G. VOLONTERIO (1973):

Nitrate Content of Milk.
Latte 167.

ROWLAND, I.R. und P. GRASSO (1975):

Degradation of N-Nitrosamines by Intestinal Bacteria.
Appl. Microbiol. 29, 7.

SANDER, J. (1968):

Nitrosaminsynthese durch Bakterien.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, 429.

DERSELBE (1973):

Formation of Nitroso Compounds in Man: Evaluation of the
Problem.
Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prod. 251.

SANDER, J. und G. BÜRKLE (1969):

Induktion maligner Tumoren bei Ratten durch gleichzeitige
Verfütterung von Nitrit und sekundären Aminen.
Z. Krebsforsch. 73, 54.

SANDER, J. und F. SCHWEINSBERG (1972):

Wechselbeziehungen zwischen Nitrat, Nitrit und kanzerogenen
N-Nitrosoverbindungen 1 und 2.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 156, 299, 321.

SANDER, J. und F. SEIF (1969):

Bakterielle Reduktion von Nitrat im Magen des Menschen als
Ursache einer Nitrosaminbildung.
Arzneim.-Forsch. 19, 1091.

- SANDER, J., F. SCHWEINSBERG und H.-P. MENZ (1968):
Untersuchungen über die Entstehung cancerogener Nitrosamine
im Magen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1691.
- SANDER, J., M. LADENSTEIN, J. LA BAR und F. SCHWEINSBERG (1974):
Experiments on the Degradation of Nitrosamines by Plants.
IARC Sci. Publ. 9, 205.
- SCANLAN, R.A. (1975):
N-Nitrosamines in Foods.
CRC Critical Rev. Fd. Technol. 5, 357.
- SCHEUNERT, A. und A. TRAUTMANN (1965):
Lehrbuch der Veterinär-Physiologie.
Paul Parey Verlag, Berlin, 20.
- SCHUPHAN, W. (1969):
Bildung von Nitrat und Nitrit im pflanzlichen Stoffwechsel.
Bibl. "Nutritio et Dieta" 11, 120.
- SCHWEINSBERG, F. (1974):
Rhodanid als Katalysator der Nitrosaminsynthese in vivo.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 227, 121.
- SEGAUGH, T.P., A.G. LANE und J.R. CAMPBELL (1970):
Effects of Two Levels of Nitrate and Energy on Lactating
Cows Receiving Urea.
J. Anim. Sci. 31, 142.
- SEBRANEK, J.G. und R.G. CASSENS (1973):
Nitrosamines: A Review.
J. Milk Food Technol. 36, 76.

SEN, N.P., D.C. SMITH und L. SCHWINGHAMER (1969):

Formation of N-Nitrosamines from Secondary Amines and Nitrite in Human and Animal Gastric Juice.

Fd. Cosmet. Toxicol. 7, 301.

SIEBER, R. und B. BLANC (1978):

Die gesundheitliche Beurteilung von Nitrat, Nitrit und N-Nitrosoverbindungen.

Dtsch. Molkerei-Ztg. 99, 240 und 278.

SUKEGAWA, M. und T. MATSUMOTO (1975):

Nitrate and Nitrite - Nitrogen Contents of Cows' and Human Milk.

J. Jap. Soc. Food Nutr. 28, 389.

TATE III, R.L. und M. ALEXANDER (1976):

Microbial Formation and Degradation of Dimethylamine.

Appl. Environ. Microbiol. 31, 379.

TELLING, G.M. (1972):

A Gas-Liquid Chromatographic Procedure for the Detection of Volatile N-Nitrosamines at the Ten Parts per Billion Level in Foodstuffs after Conversion to Their Corresponding Nitrosamines.

J. Chromatogr. 73, 79.

TERPLAN, G., E. HALLERMAYER, W. KALBFUS, P. UNSINN, C. GÄRTNER und C. HEERDEGEN (1978):

Untersuchungen zum Vorkommen von Nitrosaminen in Futtermitteln, Milch und Milchprodukten.

Milchwissenschaft 33, 142.

THACKER, L. und J.B. BROOKS (1974):

In Vitro Production of N-Nitrosodimethylamine and Other Amines by Proteus Species.

Infect. Immun. 9, 648.

WANG, L.C., J. GARCIA-RIVERA und R.H. BURRIS (1961):
Metabolism of Nitrate by Cattle.
Biochem. J. 81, 237.

WEIHRAUCH, J.L. und D.P. SCHWARTZ (1974):
Trace Constituents in Whey. Isolation and Identification
of Amines.
J. Dairy Sci. 57, 83.

WIESNER, E., BERSCHNEIDER, F. und H. LIEBENOW (1970):
Ernährungsschäden der landwirtschaftlichen Nutztiere.
Gustav Fischer Verlag, Jena, 241.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und die gern gewährte, bereitwillige Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Kalbfus von der Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung, der die Messungen am Massenspektrometer durchführte, sowie den Mitgliedern des Institutes für Hygiene und Technologie der Milch für ihre Hilfeleistungen.

Frau J. Edenhofer und Frau I. Daffner danke ich für das Schreiben dieser Arbeit.

L e b e n s l a u f

Geboren wurde ich am 12. September 1946 in München als Tochter des Kaufmanns Erhard Heerdegen und seiner Ehefrau Maria Heerdegen, geborene Scheuerer.

Nach dem Besuch der Volksschule und des neusprachlichen Gymnasiums legte ich 1967 am Gymnasium der Armen Schulschwestern zu München am Anger die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1967/68 begann ich mein Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität in München. Ab dem Wintersemester 1970/71 setzte ich mein Studium an der Tierärztlichen Hochschule Hannover fort und beendete es dort 1973 mit dem Staatsexamen. Meine Bestallung als Tierärztin erhielt ich mit Wirkung vom 4. Oktober 1974.

